

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



**Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados
humanos de *Leptospira sp.* e diferenciação molecular de estirpes isoladas
dos principais reservatórios silváticos**

Ana Teresa da Silva Gonçalves

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

2009

**A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora
do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de
Lisboa em reunião de 26 de Janeiro de 2010**

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



**Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados
humanos de *Leptospira sp.* e diferenciação molecular de estirpes isoladas
dos principais reservatórios silváticos**

Ana Teresa da Silva Gonçalves

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Dissertação orientada pela Inv^a.
Doutora Margarida Collares Pereira

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

Agradecimentos

À Investigadora Doutora Margarida Collares Pereira, por me ter concedido a oportunidade única de realizar este trabalho, pela sua dedicação, profissionalismo e sentido crítico. Por me acolher de braços abertos e ter o rigor e a honestidade como apanágio da sua forma de estar e fazer ciência. Os ensinamentos que fui consolidando ao longo deste percurso irão certamente acompanhar-me ao longo da vida e foi um enorme privilégio tê-lo feito pela sua mão e na sua companhia.

Ao Professor Doutor Melo Cristino, por ter aceite ser co-orientador deste trabalho, pela sua disponibilidade e simpatia. A sua competência e qualidade na docência imprimem à Microbiologia clínica uma nova dinâmica tornando-a bastante aliciante e acessível a profissionais com diferentes *backgrounds* na área da saúde.

À Doutora Luísa Vieira, pelo sem número de ajudas nas mais variadas frentes, pela inteira disponibilidade e amizade.

À Dra Mónica Nunes, pelo exímio profissionalismo e amizade. O seu apoio no laboratório foi uma peça fundamental para levar avante este trabalho.

À Dra Teresa Carreira por toda a ajuda prestada, pela disponibilidade sempre manifestada, e pela pronta resposta às minhas dúvidas.

À equipa do projecto de investigação da Leptospirose nos Açores, a qual tive a honra de integrar, pela experiência única de fazer parte de um estudo com tamanho impacto na qualidade de vida da população açoriana; em especial à equipa de campo que realizou as capturas dos roedores, aos técnicos e médicos do HDESPD e aos membros do Royal Tropical Institute, Dr. Ahmed Ahmed e Dr. Rudy Harstkeerl, pelos vários contributos nas diferentes áreas.

Aos meus pais, eternos companheiros de viagem, por serem peças basilares no incentivo à realização deste trabalho, pelo seu apoio incondicional, constante e inestimável. Ao João pelo seu multifacetado espírito de equipa, companheirismo, compreensão e partilha.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

Resumo

A Leptospirose, doença infecciosa re-emergente causada por bactérias do género *Leptospira*, é considerada um importante problema de Saúde Pública nos Açores. Nos últimos anos, o elevado número de casos humanos com desfecho fatal aumentou a preocupação sobre factores de risco e potenciais fontes de infecção, enfatizando a necessidade de isolamento/identificação das estirpes patogénicas humanas.

O presente estudo caracteriza os primeiros isolados de *Leptospira* (n=10) de doentes de São Miguel, assim como 257 isolados das três espécies de roedores, principais reservatórios silváticos locais. O uso de anti-soros de referência hiperimunes e anticorpos monoclonais permitiu a identificação antigénica dos isolados humanos ao nível do sorogrupo e sorovar, respectivamente. Os isolados humanos e murinos foram classificados como estirpes *L. interrogans* s.l. pelo PCR-G1/G2 e a diferenciação molecular ao nível do sorogrupo foi feita pelo PCR-iRep1. A identificação das espécies genómicas foi efectuada por sequenciação do DNA da totalidade dos isolados humanos e de 8,2% dos isolados murinos. A detecção de aglutininas específicas anti-*Leptospira* foi efectuada pela TAM em doentes com cultura positiva e em 535 roedores locais.

Sete (70%) dos 10 isolados humanos foram identificados como *L. interrogans* s.s. sorovar Copenhageni e três (30%) como *L. borgpetersenii* sorovar Arborea, o que esteve de acordo com os sorogrupos identificados em isolados murinos (29,6% Icterohaemorrhagiae; 70,4% Ballum). As sorologias humanas e de roedores estiveram também em consonância com as estirpes isoladas, na sequência da detecção de títulos significativos anti-Icterohaemorrhagiae e anti-Ballum, com títulos geométricos médios: doentes ($TGM_{Ictero}=2276$; $TGM_{Bal}=1000$) e *Rattus sp.* ($TGM_{Ictero}=306$; $TGM_{Bal}=261$), e um valor de $K>0,81$ entre o PCR-iRep1 e a TAM.

A diferenciação dos sorogrupos por PCR-iRep1 demonstrou ser um método rápido e eficaz a utilizar em estudos epidemiológicos.

Em conclusão, este trabalho representou um passo fundamental na identificação definitiva das leptospirosas patogénicas que afectam os doentes Açorianos, confirmando pela primeira vez a sua conexão bacteriológica com as estirpes que infectam roedores.

Palavras-chave: Leptospirose; Açores; isolados humanos; identificação bacteriológica; roedores.

Abstract

Leptospirosis, a re-emergent infectious disease caused by pathogenic bacteria of genus *Leptospira*, is a relevant public health problem in the Azores. In recent years, the higher number of human fatal cases has led to an increasing concern about risk factors and potential infection sources, reinforcing the need for the isolation of the human infective leptospires.

The present work characterizes the first human *Leptospira* strains (n=10) obtained from São Miguel inpatients, as well as a sample of rodent-field isolates (n=257) obtained from the three local free-living murine species, the main sylvatic reservoirs. The use of hyperimmune rabbit antisera and monoclonal antibodies allowed the antigenic identification of human isolates at the serogroup and serovar levels, respectively. Human and rodent isolates were assigned at *L. interrogans* s.l. by PCR-G1/G2 and the molecular serogroup discrimination was done by PCR-iRep1 in both groups. Species identification was performed by DNA sequencing in all human isolates and 21 (8.2%) rodent strains. MAT specific sero-agglutinins were checked in the culturally positive inpatients and in 535 local rodents.

Seven of the ten (70%) human isolates were identified as *L. interrogans* s.s. serovar Copenhageni and three (30%) as *L. borgpetersenii* serovar Arborea, which was in agreement with the molecular serogroups found in the analysed rodents (Icterohaemorrhagiae, 29.6% and Ballum, 70.4%). Human and animal serologies were also in accordance with the infective strains identified through the detection of significant geometric mean titers anti-Icterohaemorrhagiae and anti-Ballum, as follows: patients (GMT_{Ictero}=2276 and GMT_{Bal}=1000) and *Rattus* sp. (GMT_{Ictero}=306 and GMT_{Bal}=261), with a K-value>0.81

between PCR-iRep1 and MAT. The adopted PCR-iRep1 approach was a reliable/rapid method for serogroup differentiation and can be used in further epidemiological studies.

This study represents a great step towards the definitive identification of the pathogenic leptospires in Azorean inpatients and confirms the bacteriological human rodent connection for the first time.

Key-words: Leptospirosis; Azores; human isolates; bacteriological identification; rodents.

No âmbito da presente investigação foi submetido o seguinte artigo científico que aguarda revisão:

Gonçalves, A. T., Paiva, C., Melo-Mota, F., Vieira, M. L., Nunes, M. S., Carreira, T., Mota-Viera, L., Ahmed, A., Hartskeerl, R. A., Hyde, K., Collares-Pereira, M. 2009. First isolation of human *Leptospira* strains (Azores, Portugal). International Journal of Infectious Diseases. (*Manuscript being revised*).

Lista de Abreviaturas e Siglas

Acs – Anticorpos
Bal – Ballum
BSA – Albumina de Soro de Bovino
CAAT-*Cross agglutinin absorption test*
Cft. – Confronte-se
Cit. – Citado
dATP – Desoxiadenina-trifosfato
dCTP – Desoxicitosina-trifosfato
DGPC – Direcção Geral de Protecção de Culturas
dGTP – Desoxiguanina-trifosfato
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleótido-trifosfato
DP – Desvio Padrão
dTTP – Desoxitimina-trifosfato
e.g. – Por exemplo (latim: *exempli gratia*)
EDTA – Acido Etilenodiaminotetraacético
EMJH – Ellinghausen McCullough Johnson Harris
et al. – E outros (latim: *et alii*)
Etbr – Brometo de etídio
g – Aceleração gravítica
g – Grama
GMT– Geometric mean titer
h – Hora
H –Estudo Horizontal
HDESPD – Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada
i.e. – isto é (latim: *id est*)
Ictero – Icterohaemorrhagiae
IgG – Imunoglobulina de classe G
IgM – Imunoglobulina de classe M
IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical
ILS – *International Leptospirosis Society*
K – estatística de Kappa
Kb – Quilobase
LCR – Líquido cefaloraquideano

LPS – Lipopolissacáridos
M – Molar
mab – Anticorpo monoclonal
MAT – *Microscopic agglutination test*
Mb – Megabase
mg – Miligrama
Mg²⁺ – íões magnésio
MgCl₂–Cloreto de magnésio
min. – Minutos
ml – Mililitro
MLST – *Multiple Locus Sequence Typing*
n – Número
NaCl – Cloreto de Sódio
Nº – Número
Nov. – Novembro
°C – Grau Celsius
OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde/World Health Organization
Out. – Outubro
pág. – página
pb – Par de bases
PBS – *Phosphate Buffer Saline* (Solução salina tamponada com fosfatos)
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reacção em Cadeia da Polimerase)
PFGE– *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
pmol – Picamol
REA – *Restriction Endonuclease Analysis*
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
S.I. – Sorogrupo Indeterminado
s.l. – sensu lato
s.s.. – sensu stricto
TAE – Tampão Tris-base, Ácido acético e EDTA
TAM – Técnica de Aglutinação Microscópica
TE – Tampão Tris-base e EDTA
TGM – Título Geométrico Médio
U – Unidade
ULBL – Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme
V – Estudo Vertical
V – Volts

% mol G+C – percentagem molar de Guanina e Citosina

µg – Micrograma

µl – Microlitro

µm – Micrómetro

µM – Micromolar

5-FU – 5-Fluorouracilo

Índice

Resumo	ii
Abstract	iv
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
Índice de Figuras	xiv
Índice de Tabelas	xvi
Índice de Gráficos	xviii
Parte I. Introdução à Leptospirose	1
1. Definição	2
2. Retrospectiva histórica	2
3. Epidemiologia: situação mundial e enquadramento da doença em Portugal	3
4. Caracterização dos agentes etiológicos (Género <i>Leptospira</i>)	5
4.1. Morfologia, motilidade e divisão	5
4.2. Fisiologia e metabolismo	8
4.3. Características culturais	8
4.4. Características genómicas	9
5. Taxonomia e classificação	12
5.1. Classificação antigénica	12
5.2. Classificação genotípica/molecular	13
5.3. Abordagem polifásica	14
6. Ciclo silvático (reservatórios/hospedeiros e transmissão)	14
7. Quadro clínico	17
8. Diagnóstico laboratorial	19
8.1. Exames directos (pesquisa do agente)	20
8.1.1. Microscopia de fundo escuro	20
8.1.2. Cultura	21
8.1.3. Técnica de PCR	22
8.1.3.1. Fundamento	23
	x

8.1.3.2.	Etapas	24
8.1.3.3.	Componentes da reacção	25
8.2.	Exames indirectos (pesquisa de anticorpos específicos anti- <i>Leptospira</i>)	26
8.2.1.	Técnicas de rastreio (<i>e.g.</i> , Teste de Aglutinação Macroscópica)	26
8.2.2.	Técnica de referência (Teste de Aglutinação Microscópica)	27
9.	Tratamento e prevenção	29
 Parte II. Caracterização dos primeiros isolados humanos de <i>Leptospira sp.</i> e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos na ilha de São Miguel (Açores)		32
1.	Objectivos do estudo	33
2.	Justificação do estudo	33
3.	Material e Métodos	35
3.1.	Material biológico	35
3.1.1.	Culturas de referência e isolados nacionais de <i>Leptospira sp.</i>	35
3.1.2.	Isolados de <i>Leptospira</i> e soros de doentes internados no Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada	35
3.1.3.	Isolados de <i>Leptospira</i> de roedores capturados em São Miguel	35
3.1.4.	Soros de roedores capturados em São Miguel	36
3.2.	Métodos	38
3.2.1.	Obtenção e identificação dos isolados humanos de <i>Leptospira sp.</i>	38
3.2.1.1.	Colheita de sangue e preparação das hemoculturas no HDESPD	38
3.2.1.2.	Isolamento e manutenção <i>in vitro</i> dos isolados humanos	38
3.2.1.3.	Análise antigénica	39
3.2.1.3.1.	Anti-soros de referência hiperimunes (estatuto de sorogrupo)	39
3.2.1.3.2.	Anticorpos monoclonais (estatuto de sorovar)	40
3.2.1.4.	Análise molecular	40
3.2.1.4.1.	Extracção e purificação de DNA	40
3.2.1.4.2.	Aplicação da Técnica de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)	42
3.2.1.4.3.	Sequenciação	45
3.2.2.	Obtenção e identificação dos isolados murinos de <i>Leptospira sp.</i>	46
3.2.2.1.	Colheita do rim e preparação das culturas na DGPC	46
		xi

3.2.2.2.	Isolamento, manutenção <i>in vitro</i> e armazenamento dos isolados	46
3.2.2.3.	Recuperação dos isolados para identificação molecular	46
3.2.2.4.	Testes de identificação molecular (PCR-G1/G2; PCR-iRep1 e sequenciação)	47
3.2.3.	Pesquisa de anticorpos anti-<i>Leptospira</i>, pela técnica de referência, em soros de doentes e de reservatórios silváticos (murinos)	48
3.2.3.1.	Preparação dos antígenos de referência	48
3.2.3.2.	Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM)	48
3.2.3.3.	Crítérios de leitura e interpretação do teste de referência	49
3.2.4.	Tratamento de dados	50
4.	Resultados	51
4.1.	Identificação dos isolados humanos de <i>Leptospira</i> spp	51
4.1.1.	Análise antigénica	51
4.1.1.1.	Anti-soros de referência hiperimunes e anticorpos monoclonais	52
4.1.2.	Análise molecular	55
4.1.2.1.	PCR-G1/G2	55
4.1.2.2.	PCR-iRep1	55
4.1.2.3.	Sequenciação	57
4.2.	Identificação molecular dos isolados murinos	60
4.2.1.	PCR-G1/G2	60
4.2.2.	PCR-iRep1	60
4.2.3.	Sequenciação	64
4.3.	Resultados da pesquisa sorológica	65
4.3.1.	Doentes com cultura positiva	65
4.3.2.	Roedores	66
5.	Discussão	71
6.	Considerações finais / Conclusões	80
	Referências bibliográficas	81
	Anexos	I
	Anexo I – Hemoculturas	II
	Anexo II – Meios de cultura	III
	Anexo III – Testes de crescimento (fenotípicos)	V
		xii

Anexo IV – Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM)	VII
Anexo V – Extração e purificação de DNA (Kit Gentra [®])	XII
Anexo VI – Tampões	XIV
Anexo VII – Necrópsia e cultura de rim	XV
Anexo VIII – Cálculo dos títulos geométricos médios (TGM)	XVII

Índice de Figuras

1. Esquema ilustrativo das características estruturais da espiroqueta <i>Leptospira</i> em corte longitudinal (A) e transversal (B) (adaptado de Quinn <i>et. al.</i> ⁷⁴).....	6
2. Imagem em microscópio electrónico de alta-resolução de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhagueni: A – Extremidades características em gancho; B – Pormenor das espiras apertadas e regulares (x3000) (adaptado de Bharti <i>et al.</i> ¹⁰).	7
3. Número de genes únicos e partilhados por <i>L. biflexa</i> (saprófita), <i>L.interrogans</i> (patogénica) e <i>L. borgpetersenii</i> (patogénica) (adaptado de Picardeau <i>et al.</i> ¹²).....	10
4. Risco de transmissão de <i>Leptospira sp.</i> a potenciais reservatórios e hospedeiros acidentais.....	15
5. Esquema de evolução da Leptospirose humana (adaptado de Vieira ⁹⁷).....	18
6. Representação esquemática do teste sorológico de rastreio da Leptospirose: técnica de aglutinação macroscópica sobre lâmina, cujo resultado se obtém em cerca de 4 minutos.(fonte: protocolo da ULBL/IHMT).	27
7. Técnica de aglutinação microscópica (TAM). A-Testemunha; B1-B5 intensidade crescente de aglutinação: B1 (75% livres); B2 (50% livres); B3 (25% livres); B4-B5 (\cong 0% livres) (adaptado de Collares-Pereira ²²).	28
8. PCR-G1/G2 – resultados obtidos na análise dos isolados humanos de <i>Leptospira</i> spp. M-marcador 100-1000 pb; 1-AzHuL01; 2-AzHuL02; 3-AzHuL03; 4-AzHuL04; 5-AzHuL05; 6-AzHuL06; 7-AzHuL07; 8-AzHuL08; 9-AzHuL09; 10-AzHuL10; 11-Controlo negativo (2 ^a nível PCR); 12- Controlo Positivo (RGA – sorogrupo Icterohaemorrhagiae).	55
9. PCR-iRep1 – perfis dos primeiros isolados de <i>Leptospira</i> spp provenientes de doentes Açorianos com diagnóstico de Leptospirose. M-Marcador de peso molecular 100-3000 pb; 1-AzHuL01; 2-AzHuL02; 3-AzHuL03; 4-AzHuL04; 5-AzHuL05; 6-AzHuL06; 7- AzHuL07; 8-AzHuL08; 9-AzHuL09; 10-AzHuL10; 11-controlo negativo (2 ^o nível-PCR); 12-sorogrupo Ballum (estirpe Mus 127/ sorovar Aborea).	56
10. PCR-iRep1 – perfis de isolados humanos e murinos do género <i>Leptospira</i> provenientes dos Açores. M- Marcador de peso molecular 100-3000 pb; 1-3 Isolados humanos do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (AzHuL01, AzHuL05, AzHuL08); 4-5: sorogrupo Icterohaemorrhagiae (estirpe RGA/sorovar Icterohaemorrhagiae e estirpe M20/sorovar Copenhagueni); 6-7: Isolados de roedores da ilha Terceira do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (AzTRoPu74, AzTRoH91); 8-10: Isolados humanos do sorogrupo Ballum (AzHuL04, AzHuL06, AzHuL09); 11-12: sorogrupo Ballum (estirpe Mus 127/sorovar Ballum e estirpe Arborea/sorovar Arborea); 13-14: Isolados de roedores de São Miguel do sorogrupo Ballum (AzSMRoS130, AzSMRoS184); 15: sorogroupo Sejroe (estirpe Hardjo-bovis /sorovar Hardjo); 16: sorogroupo Canicola (estirpe Hond Utrecht IV/sorovar Canicola); 17: sorogroupo Australis (estirpe Jêz Bratislava/sorovar Bratislava); 18: sorogroupo Pomona (estirpe Mozdok/sorovar Pomona).....	56

11. Árvore filogenética baseada nas distâncias Tamura-Nei e elaborada, utilizando o Método de Neighbour-Joining. As distâncias foram calculadas a partir das sequências de restrição G1-G2 e baseiam-se em 32 estirpes de *Leptospira*. Legenda: *L. interrogans* (Int.), isolados de roedores – AzTRoPu74, AzTRoH91, e humanos – AzHuL01-03, AzHuL05, AzHuL07-08, AzHuL10; *L. borgpetersenii* (Bor.), isolados de roedores – AzSMRoS184, AzSMRoS130, e humanos – AzHuL04, AzHuL06, AzHuL09; e estirpes de referência (as restantes sequências). Os números representam a percentagem de *bootstrapping* (1000 replicados). Apenas valores *bootstrap* acima dos 50% são mostrados. A estirpe saprófita Patoc 1, utilizada como referência, não pertence ao complexo *Leptospira interrogans* sensu lato. 58

12. PCR-G1/G2 - resultados obtidos na análise de isolados de *Leptospira* de roedores murinos capturados na ilha de São Miguel, no âmbito dos Estudos Horizontal (H) e Vertical (V), do Projecto de Investigação da Leptospirose nos Açores. M-marcador 100-1000 pb; 1-H318; 2-H306; 3-H408; 4-H467; 5-H471; 6-H458; 7-H474; 8-H515; 9-V125, 10-V200; 11-V221; 12-V288; 13-V213; 14-V251; 15-V108; 16-V137; 17-Controlo negativo (2º nível-PCR); 18-Controlo positivo (RGA-Icterohaemorrhagiae)..... 60

13. PCR-iRep1 – perfis de isolados de *Leptospira* obtidos de roedores murinos capturados em São Miguel (H=Estudo Horizontal) e de estirpes de referência. M-Marcador 100-3000 pb; 1-H164; 2-H112; 3-H1; 4-H521; 5-H514; 6-H417; 7-H383; 8-H331; 9-H442; 10-H512; ; 11-H113; 12-H406; 13-estirpe M20/sorovar Copenhageni/sorogrupo Icterohaemorrhagiae); 14-estirpe Mus127/sorovar Ballum/sorogrupo Ballum); 15-estirpe Arborea/sorovar Arborea/sorogrupo Ballum); 16-controlo negativo (1º nível-extração de DNA); 17-controlo negativo (2º nível-PCR)..... 61

14. PCR-iRep1 – perfis de isolados obtidos de roedores murinos capturados em São Miguel (H=Estudo Horizontal). 1-H145; 2-H370; 3-H505; 4-H439; 5-H211; 6-H446; 7-H430; 8-H387; 9-H320; 10-controlo negativo (1º nível-extração de DNA); 11-Controlo negativo (2º nível-PCR); 12-estirpe Mus127/sorovar Ballum/sorogrupo Ballum); M-Marcador 100-3000 pb..... 61

15. PCR-iRep1 – perfis de isolados de *Leptospira* obtidos de roedores capturados em São Miguel (V=Estudo Vertical). M-Marcador 100-3000 pb; 1-V82; 2-V93; 3-V67; 4-M20 (estirpe de referência-sorogrupo Icterohaemorrhagiae); 5-V174; 6-V33; 7-V56; 8-V163; 9-V65; 10-V91; 11-estirpe Mus127/sorovar Ballum/sorogrupo Ballum); 12-V54; 13-V164; 14-V13; 15-V167; 16-V9; 17-V28; 18-V76. 62

16. Perfis PCR-iRep1 de estirpes de *Leptospira* pertencentes à Leptospiroteca da ULBL/IHMT. M-marcador 100-2000 pb. 1-Patoc 1 (sorogrupo Semarang); 2-RGA (sorogrupo Icterohaemorrhagiae); 3-M20 (sorogrupo Icterohaemorrhagiae); 4-Mozdock (sorogrupo Pomona); 5-Valbuzii (sorogrupo Grippotyphosa); 6-Hond Utrecht IV (sorogrupo Canicola); 7-Bratislava (sorogrupo Australis); 8-Arborea (sorogrupo Ballum); 9-Ballico (sorogrupo Australis); 10-Louisiana (sorogrupo Louisiana); 11-Swart (sorogrupo Bataviae); 12-M20 (isolado de ouriço-cacheiro, São Miguel)/sorogrupo Icterohaemorrhagiae; 13-M84 (sorogrupo Sejroe); 14-Celledoni (sorogrupo Celledoni)..... 62

Índice de Tabelas

1. Principais características dos genomas de estirpes patogênicas e saprófitas de <i>Leptospira</i> spp (adaptado de Adler <i>et al.</i> ¹).	10
2. Lista dos antígenos (estirpes de referência e isolados nacionais), pertencentes à Leptospiroteca da ULBL/IHMT, que foram utilizados nos testes de identificação antigênica e molecular, e/ou na técnica de aglutinação microscópica.	37
3. Sequências dos <i>primers</i> G1 e G2 com indicação do tamanho do fragmento amplificado e das regiões do gene <i>secY</i> em que ocorre o <i>annealing</i> ³⁹	43
4. Etapas do processo de amplificação de DNA pelo PCR com os <i>primers</i> G1 e G2 ³⁹	43
5. Etapas do processo de amplificação de DNA pelo PCR-iRep1 ⁹	44
6. Identificação dos isolados humanos (AzHuL01-AzHuL5) de <i>Leptospira</i> spp ao nível do sorogrupo, de acordo com os títulos de aglutinação dos respectivos anti-soros de referência hiperimunes.....	52
7. Identificação dos isolados humanos (AzHuL06-AzHuL10) de <i>Leptospira</i> spp ao nível do sorogrupo, de acordo com os títulos de aglutinação dos respectivos anti-soros de referência hiperimunes.....	52
8. Títulos de aglutinação (recíprocos) dos anticorpos monoclonais (mAbs) do sorogrupo Icterohaemorrhagiae com estirpes de referência dos sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, e os isolados humanos AzHuL01 e AzHuL02.	53
9. Títulos de aglutinação (recíprocos) dos anticorpos monoclonais (mAbs) do sorogrupo Ballum com estirpes de referência dos sorovares Arborea e Ballum, e com os isolados humanos AzHuL04, AzHuL06 e AzHuL09.	54
10. Resumo dos resultados obtidos na caracterização antigênica e molecular dos dez isolados humanos de <i>Leptospira</i>	59
11. Distribuição dos isolados murinos de <i>Leptospira interrogans</i> s.l., de acordo com o sorogrupo (resultado do PCR-iRep1) e o habitat/espécie de roedor capturado na Ilha de São Miguel (2004-2006)*	63
12. Resultados da sorologia (TAM) em amostras séricas (seriadas) dos 10 doentes com hemocultura positiva para <i>Leptospira</i>	65
13. Cálculo do Título Geométrico Médio (TGM) para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae, em sete doentes com Leptospirose e hemocultura positiva.	66

14. Cálculo do Título Geométrico Médio (TGM) para o sorogrupo Ballum,. em três doentes com Leptospirose e hemocultura positiva.	66
15. Resultados da sorologia (TAM) e da análise molecular (PCR-iRep1) do sorogrupo infectante em 128 roedores com cultura de rim positiva.	67
16. Estimativa da concordância dos resultados positivos da sorologia (sorogrupo presuntivo) <i>versus</i> análise molecular (sorogrupo), através da estatística Kappa (K).	68
17. Resultados da sorologia (TAM) em 163 roedores com cultura de rim positiva (<i>L. interrogans</i> s.l.), mas sem identificação molecular do sorogrupo dos respectivos isolados.	69
18. Resultados da sorologia (TAM) em 244 roedores com cultura de rim negativa.	70

Índice de Gráficos

1. Títulos de aglutinação (recíprocos) dos anticorpos monoclonais (mAbs) do sorogrupo Icterohaemorrhagiae com o isolado humano AzHuL01 e estirpes de referência dos sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae 54
2. Títulos de aglutinação (recíprocos) dos anticorpos monoclonais (mAbs) do sorogrupo Ballum com o isolado humano AzHuL04 e estirpes de referência dos sorovares Arborea e Ballum. 54
3. Representação esquemática dos sorogrupos de *Leptospira interrogans* s.l. versus espécie de roedor com cultura positiva, após análise pelo PCR-iRep1, de 257 isolados de *Leptospira* obtidos de roedores capturados na Ilha de São Miguel, no âmbito do Projecto de Investigação da Leptospirose nos Açores (Bal=Ballum; Ictero=Icterohaemorrhagiae). 63
4. Distribuição, por espécie de roedor e biótopo, dos sorogrupos de *Leptospira* identificados pelo PCR-iRep1 em 257 isolados obtidos de roedores murinos capturados em São Miguel, no âmbito do Projecto de Investigação da Leptospirose nos Açores (2004-2008)..... 64

Parte I

Introdução à Leptospirose

Parte I. Introdução à Leptospirose

1. Definição

A Leptospirose é uma doença bacteriana causada por espiroquetas do género *Leptospira* (família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales). É uma zoonose de ampla distribuição geográfica que há mais de um século se reconhece como causadora de doença no Homem e nos animais, tendo por vezes graves consequências ao nível da Saúde Pública e da Produção Animal¹⁰. Os animais são os hospedeiros primários essenciais para a persistência de focos de infecção, enquanto que os seres humanos são hospedeiros acidentais e, por isso, pouco eficientes na disseminação dos agentes causais¹⁰¹.

2. Retrospectiva histórica

A doença humana foi descrita pela primeira vez em 1812 por Larrey⁶⁰. No entanto, foi Adolf Weil quem, em 1886, descreveu minuciosamente um caso humano de Leptospirose com icterícia e insuficiência renal. O seu nome ficou associado aos casos graves de doença humana da responsabilidade dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni do complexo *Leptospira interrogans sensu lato* (s.l.)³⁷. Em 1907, Stimson atribuiu a designação *Spirochaeta interrogans* ao verificar a presença de organismos espiralados com as extremidades em forma de gancho (assemelhando-se a um ponto de interrogação), no tecido renal de um doente com suspeita de febre amarela⁸⁶. Este episódio lançou as bases da nomenclatura do agente etiológico da doença de Weil. Entre 1914 e 1915, a natureza contagiosa e a origem microbiana da doença foram comprovadas no Japão por Inada e Ido, tendo a mesma descoberta sido feita em simultâneo e de forma independente por Uhlenhuth e

Fromme na Alemanha⁸¹. Em 1917, a referida equipa japonesa, descreveu o papel dos roedores enquanto reservatórios silváticos de leptospiros, abrindo caminho à compreensão dos princípios epidemiológicos sobre a transmissão destes agentes zoonóticos³⁷. Actualmente, os roedores são considerados os principais responsáveis pela disseminação global dos agentes causais, sendo possível detectar casos de Leptospirose nos cinco continentes. Ao longo da História, outras designações, além de “Doença de Weil“, têm sido atribuídas à Leptospirose, tais como: “Icterícia dos Apanhadores de Arroz” na China, “Febre Outonal” no Japão, “Doença dos Tratadores de Porcos” na Europa, “Gripe dos Trabalhadores dos Esgotos” nos Estados Unidos ou “Doença dos Ratos” no Arquipélago dos Açores.

3. Epidemiologia: situação mundial e enquadramento da doença em Portugal

Nas últimas décadas, a Leptospirose reemergiu como uma doença infecciosa de importância global, ocorrendo em áreas urbanas de países industrializados e desenvolvidos, assim como, em regiões rurais em todo o mundo^{10,59}. A epidemiologia da doença varia de acordo com a área geográfica e o clima. Em regiões temperadas, a Leptospirose é considerada uma doença sazonal, com picos de incidência no Verão e/ou no Outono, sendo a temperatura o factor limitante para a sobrevivência das bactérias na natureza⁵². Nas regiões tropicais, o clima húmido, a ocorrência de elevados níveis de precipitação e o frequente défice em saneamento básico expõem as populações a um elevado risco de contágio anual. Em países desenvolvidos, a doença surge associada a determinados grupos de risco (*e.g.*, veterinários, tratadores de gado e trabalhadores rurais) e a certas actividades de lazer (*e.g.*, jardinagem, canoagem e golfe), que implicam um maior contacto, directo ou indirecto, com a água, solo e/ou tecidos contaminados pela urina dos animais infectados, hospedeiros e reservatórios¹⁰.

O interesse por esta patologia sofreu novo impulso, dada a ocorrência de surtos graves como na Nicarágua, em 1995, durante os quais morreram centenas de pessoas vítimas de febre hemorrágica que se provou ser causada por leptospiros⁹¹. Desde então, estudos desenvolvidos em várias regiões tais como: Hawai³³, Estados Unidos da América⁶², Seychelles¹⁰⁴, Israel⁴⁰, Índia⁸³, Brasil^{48,77}, Cuba⁸⁷, Chile⁷¹, Austrália⁸⁴ e Moçambique²⁴, demonstram a importância crescente desta patologia associada à frequente detecção de anticorpos anti-*Leptospira* nas populações.

Em Portugal continental, o primeiro caso de Leptospirose humana foi descrito em Lisboa por Luís Figueira em 1931. O estudo mais aprofundado sobre a epidemiologia e diagnóstico desta patologia teve início nos anos quarenta por Fraga de Azevedo e colaboradores, que realizaram inquéritos sorológicos em diversas espécies animais do continente, durante um período de trinta anos⁷. Esta investigação foi retomada por Collares-Pereira nos anos oitenta, tanto ao nível dos reservatórios silváticos e domésticos, como do imunodiagnóstico humano^{21,22,23}. Um estudo recente, de âmbito nacional e abrangendo um período de dezasseis anos, veio confirmar que a Região Centro e o Arquipélago dos Açores são as áreas geográficas com maiores taxas de infecção humana, na sequência de um ciclo zoonótico estável (áreas endémicas)⁹⁸.

De acordo com o referido estudo, a taxa de incidência nos Açores, entre 1993 e 2003, foi de 11,1 casos por 100.000 habitantes/ano, valor dez vezes superior à incidência da doença em Portugal continental⁹⁸. De salientar, ainda, que nos últimos anos se tem verificado um aumento do número de casos, por vezes com desfecho fatal, sobretudo nesta região insular³⁰. Actualmente, os sorogrupos patogénicos com maior predominância em Portugal continental, nos doentes com Leptospirose, são Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Sejroe, Canicola, Ballum, Australis, Pomona e Tarassovi⁹⁸. No Arquipélago dos Açores, em particular nas ilhas

de São Miguel e Terceira, os sorogrupos mais prevalentes são Icterohaemorrhagiae e Ballum, o que estará relacionado com a respectiva predominância ao nível das populações de roedores, reservatórios silváticos de eleição destas espiroquetas²⁵.

Desde 1986, que todas as infecções humanas de Leptospirose, independentemente do sorovar infectante, estão integradas na lista de Doenças de Declaração Obrigatória (Portaria 766/86 de 26 de Dezembro de 1986), estando para os casos da responsabilidade do sorogrupo Icterohaemorrhagiae desde 1950. No entanto, e apesar de ser uma doença de notificação obrigatória, o problema do subdiagnóstico persiste, não só em Portugal como em todo o mundo. A sub-notificação da Leptospirose deve-se, nomeadamente, à falta de suspeita médica dado o acentuado polimorfismo clínico, às dificuldades técnicas do diagnóstico sorológico e/ou bacteriano, à ausência de meios de diagnóstico e de sistemas de notificação apropriados (sobretudo em regiões com graves carências financeiras) e à reduzida investigação epidemiológica para avaliar os potenciais factores de risco. Assim sendo, e embora a Leptospirose seja considerada a zoonose mais amplamente disseminada no mundo, a respectiva incidência mundial está ainda por determinar^{1,52}.

4. Caracterização dos agentes etiológicos (Género *Leptospira*)

4.1. Morfologia, motilidade e divisão

Os espiroquetídeos do género *Leptospira* apresentam um cilindro protoplasmático rígido, revestido pela parede celular e pela membrana citoplasmática. A envolver esta estrutura existe um envelope externo ou membrana exterior (túnica), e entre as duas membranas (citoplasmática e externa), situam-se os flagelos periplásmicos em número variável³⁷ (**Figura 1**).

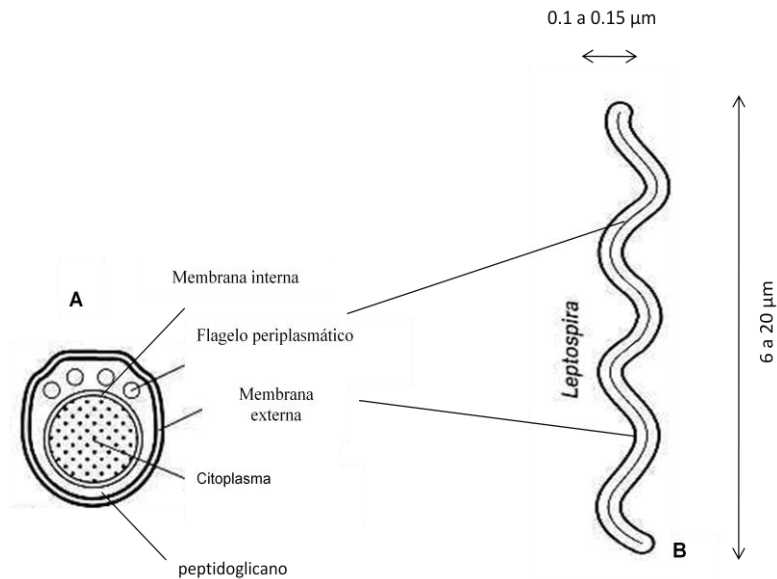


Figura 1. Esquema ilustrativo das características estruturais da espiroqueta *Leptospira* spp em corte longitudinal (A) e transversal (B) (adaptado de Quinn *et al.*⁷⁴).

Os membros do género *Leptospira* diferem dos outros espiroquetídeos por: *i*) apresentarem uma forma helicoidal com espiras muito apertadas e regulares, *ii*) possuírem uma ou ambas as extremidades em forma de gancho (**Figura 2**), as quais podem permanecer direitas temporariamente, e *iii*) serem os únicos que atravessam os filtros com uma porosidade igual a $0,22\ \mu\text{m}$ ⁴³. Estes microorganismos espiralados têm uma morfologia muito característica, com um diâmetro de $\cong 0,1\ \mu\text{m}$ e um comprimento de 6 a $20\ \mu\text{m}$ ⁴². A observação directa é normalmente efectuada em microscópio de fundo escuro ou de contraste de fase, dada a sua reduzida dimensão e a fraca afinidade para as colorações comuns. Segundo o método de coloração tradicional são classificadas de bactérias Gram negativas. Estes microorganismos apresentam a membrana citoplasmática e a parede celular constituída por peptidoglicanos fortemente associadas e revestidas por uma membrana externa. Esta é constituída por proteínas, lípidos e polissacarídeos (LPS), assumindo uma grande importância antigénica⁵².

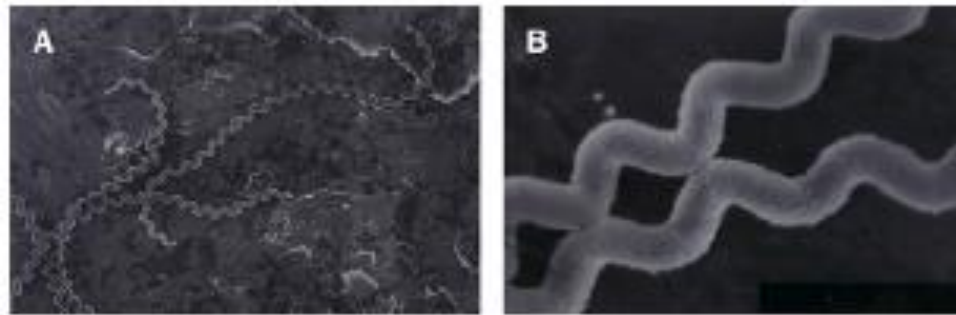


Figura 2. Imagem em microscópio electrónico de alta-resolução de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni: A – Extremidades características em gancho; B – Pormenor das espiras apertadas e regulares (x3000) (adaptado de Bharti *et al.*¹⁰).

A facilidade com que estas bactérias são transmitidas através da água sugere uma boa adaptação e uma constituição genética que lhes permite sobreviver em ambientes muito diversos; refere-se, a título de exemplo, a capacidade de expansão da membrana como um mecanismo de defesa que lhes permite sobreviver em condições ambientais hostis³⁷. As formas de vida livre (*Leptospira biflexa*) e parasitas (*Leptospira interrogans*) são morfologicamente indistintas, o mesmo ocorrendo entre sorovares da mesma espécie antigénica⁸¹. Em termos de motilidade, são bactérias filamentosas muito móveis, com dois flagelos sub-terminais (um em cada extremidade) que imprimem à célula os seguintes movimentos: de rotação (tipo “saca-rolhas”) em torno do seu eixo, de alongamento-encurtamento e de translação, consoante a natureza do meio (sólido, semi-sólido ou líquido) em que as leptospiros se encontram³⁷. Relativamente à divisão celular, estes organismos reproduzem-se por fissão binária transversal e a sua multiplicação não acontece fora do hospedeiro⁴². O processo ocorre após crescimento e alongamento das células, seguido de uma constrição que aparece ao nível do cilindro protoplasmático. Antes de finalmente se

dividirem, as leptospiros permanecem ligadas, com um movimento de rotação independente entre si³⁷.

4.2. Fisiologia e metabolismo

As leptospiros são bactérias aeróbias obrigatórias que crescem preferencialmente em meios com um pH ligeiramente alcalino (7,2 - 7,6) e à temperatura de 28 a 30°C³⁷. À semelhança da maioria dos organismos patogénicos, estas espiroquetas são fisiologicamente quimioheterotróficas, ou seja, utilizam compostos orgânicos como fontes de: energia, hidrogénio, electrões e carbono. A presença de vitaminas B1, B12 e biotina (apenas em algumas estirpes), assim como de ácidos gordos de cadeia longa, revela-se fundamental para o seu desenvolvimento. Estes microorganismos não têm a capacidade de sintetizar ácidos gordos, sendo estes compostos orgânicos imprescindíveis como fontes de carbono, de energia e de lípidos⁸¹. Outros compostos como fosfato, cálcio, magnésio, ferro e sais de amónio (fonte de nitrogénio) são também necessários ao seu crescimento. Uma das particularidades destas bactérias é o facto de serem facilmente destruídas pela acção do calor, mas sobreviverem ao frio e à congelação a - 80°C durante meses²³.

4.3. Características culturais

O meio de crescimento enriquecido mais comum é o EMJH - “Ellinghausen and McCullough” (1965) modificado por “Johnson and Harris” (1967) - que contém Tween 80 e albumina bovina^{32,44}. Uma vez que as leptospiros são resistentes à actividade do 5-fluorouracilo (5-FU), a adição deste análogo pirimidínico evita o crescimento excessivo de contaminantes, permitindo a adaptação das espiroquetas ao meio de cultura⁴⁶. A respectiva

curva de crescimento, tal como na maioria das bactérias, apresenta uma fase logarítmica e uma fase estacionária. No entanto, o crescimento das leptospiiras é muito mais lento, sendo de 10 a 12 horas o tempo de cada geração³⁷. Em meio líquido, as sub-culturas já adaptadas precisam de 7 a 10 dias para se obter uma densidade óptima (*i.e.*, $\cong 2 \times 10^8$ bactérias/ml). No entanto, este período pode prolongar-se até às 13 semanas em processos de isolamento iniciais⁹⁸. A recuperação das leptospiiras *in vitro* é, portanto, bastante fastidiosa. Em meio semi-sólido, o crescimento atinge uma densidade máxima numa zona junto à superfície, que aumenta de turbidez proporcionalmente ao tempo de incubação. Este crescimento está relacionado com a tensão óptima de oxigénio e é conhecido como disco ou anel de Dinger². A ausência de anel não significa contudo ausência de leptospiiras. Em meio líquido, o crescimento das leptospiiras apresenta-se como uma turvação do meio, com o aspecto de “nuvens”, sempre que se agita o tubo de cultura. Esta forma líquida do meio de cultura é utilizada na preparação de antígenos “vivos” para as técnicas de diagnóstico laboratorial, pois não possui as partículas de agar, que interfeririam com a leitura dos resultados¹⁰¹.

4.4. Características genómicas

O genoma de *Leptospira* spp caracteriza-se por um conteúdo em G+C de 35-41 mol% (consoante as espécies) e uma dimensão compreendida entre 3,9 e 4,6 Mb ou seja, superior à das outras duas espiroquetas de importância médica, *Treponema pallidum* e *Borrelia burgdorferi*, com 1,1 e 1,5 Mb, respectivamente^{1,78}. Até à data, foram publicados os genomas de seis espécies de leptospiiras, como segue: dois sorovares (Lai e Copenhageni) de *L. interrogans*^{64,78}, duas estirpes de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo¹⁵ e duas estirpes de *L.*

biflexa sorovar Patoc⁷². As principais características dos seus genomas estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais características dos genomas de estirpes patogénicas e saprófitas de *Leptospira* spp (adaptado de Adler *et al.*¹).

	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. interrogans</i>	<i>L. biflexa</i>
Tamanho (kb)	3931	4627	3956
Número de genes	2844	3379	3590
Número de pseudogenes	368	41	33
Número de transposases	246	26	9

As diferenças mais notórias entre *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* são a presença de um elevado número de pseudogenes e de transposases na última espécie (**Tabela 1**). A comparação genómica de duas espécies patogénicas e uma saprófita permitiu a identificação de 2052 genes comuns (**Figura 3**), corroborando a mesma origem para estas estirpes.

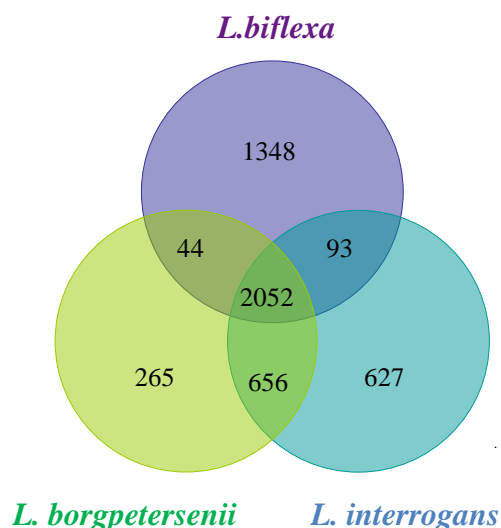


Figura 3. Número de genes únicos e partilhados por *L. biflexa* (saprófita), *L. interrogans* (patogénica) e *L. borgpetersenii* (patogénica) (adaptado de Picardeau *et al.*⁷²).

Estudos genómicos permitiram também a identificação de genes associados à patogenicidade⁷². A relação entre o conteúdo do genoma leptospírico, a patogenicidade e a capacidade de sobrevivência em diversas condições ambientais é uma temática particular de investigação que tem sido alvo de avanços recentes. Estirpes patogénicas capazes de subsistir tanto no tecido renal de reservatórios silváticos como em ambientes aquáticos apresentam genomas de maiores dimensões, os quais reflectem provavelmente a informação genética adicional necessária para a respectiva sobrevivência⁷². Os genomas das estirpes patogénicas já sequenciadas consistem em dois cromossomas circulares: o cromossoma I e o cromossoma II de menor dimensão⁶⁴.

Por sua vez, o genoma de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc 1 consiste em três replicões com um total de 3956 kb (Tabela 1). Os dois replicões de maior dimensão partilham muitas semelhanças com os dois cromossomas que constituem os genomas das quatro estirpes patogénicas já sequenciadas⁷². Estudos recentes revelaram a distribuição, pelos dois cromossomas, de genes que codificam enzimas de vias metabólicas (*e.g.* glicólise, ciclo de Krebs) e de vias de biossíntese (*e.g.* aminoácidos, co-factores)⁶⁴. O papel do terceiro replicão (74,114 pb; GC% 37,47), que não foi descrito nas estirpes patogénicas, está ainda por esclarecer. Admite-se que possa actuar como: *i*) um cromossoma contendo genes essenciais para a sobrevivência; *ii*) um elemento extracromossomal; ou *iii*) um plasmídeo⁷². Outra das características genómicas destas espiroquetas reside no facto de os genes *rrs*, *rrl* e *rrf*, que codificam para as subunidades ribossomais 16S, 23S e 5S respectivamente, se localizarem em regiões afastadas e estarem presentes em número desigual¹⁰⁵. Os genes 23S e 16S rRNA estão presentes em duplicado tanto em *L. biflexa* s.l. como em *L. interrogans* s.l.. Contudo, as primeiras apresentam duas cópias do gene 5S rRNA, enquanto as estirpes patogénicas apresentam apenas uma cópia altamente conservada do referido gene³⁷. Nos últimos anos,

várias mutações genéticas, como inserções, deleções e inversões, algumas das quais abrangendo aproximadamente 30% do genoma, foram identificadas e associadas a potenciais variações antigénicas^{16,106,11}.

5. Taxonomia e classificação

Actualmente, co-existem dois sistemas de classificação dos organismos do género *Leptospira*: o sistema de classificação tradicional, designado por “antigénico”, visto basear-se, em particular, em características antigénicas dos lipopolissacáridos (LPS) de superfície, e o sistema dito “molecular” que tem por base a análise do DNA leptospírico.

5.1. Classificação antigénica

A unidade sistemática básica na classificação antigénica/convencional é o sorovar, cujo estatuto é determinado com base nas semelhanças e diferenças “antigénicas” demonstradas pela utilização de anti-soros (de coelho) hiperimunes e pela absorção (posterior) das aglutininas específicas com antígeno(s) homólogo(s), através do teste designado por CAAT (*Cross-Agglutinin-Absorption-Test*). Mais recentemente, a utilização de anticorpos monoclonais^{25,52} revelou-se uma boa alternativa a esta abordagem fastidiosa, que requer não só a manutenção de um painel de estirpes pertencentes a mais de 200 sorovares de referência, como a produção dos anti-soros de coelho correspondentes^{47,101}. Cada sorovar é representado por uma estirpe de referência⁴⁷ e os sorovares com maior afinidade antigénica podem ser agrupados em sorogrupos. A designação “sorogrupo” não apresenta contudo significado em termos taxonómicos, revelando-se, no entanto, bastante útil do ponto de vista epidemiológico.

A classificação antigénica engloba duas espécies: *L. interrogans* que agrupa as estirpes patogénicas identificadas até ao momento (cerca de 260 sorovares, organizados em 25 sorogrupos) e *L. biflexa* (com cerca de 60 sorovares organizados em 38 sorogrupos) que inclui as formas de vida livre (saprófitas)⁹⁹.

A diferenciação entre estirpes patogénicas e saprófitas pode ser efectuada, numa primeira fase, na presença de determinados compostos (*e.g.* 8-azaguanina e NaCl) e quando sujeitas a diferentes temperaturas de crescimento^{44,45}. Com efeito, esta abordagem antigénica/fenotípica permite distinguir as estirpes patogénicas (*L. interrogans* s.l.), uma vez que estas formam células esféricas, até às 2h de incubação, em presença de NaCl (1M), e não crescem a 13°C ou na presença de 8-azaguanina (225 µg/ml), características não partilhadas pelas estirpes saprófitas (*L. biflexa* s.l.).

5.2. Classificação genotípica/molecular

Nas últimas décadas, a introdução de técnicas de biologia molecular revolucionou os métodos de classificação e, consequentemente, a taxonomia das leptospiros, com a consequente adaptação a uma abordagem semelhante. No caso do sistema molecular, a unidade básica é a espécie genómica que, por definição, apresenta um grau de homologia em hibridação DNA-DNA igual ou superior a 70% e menos de 5% de divergência entre as temperaturas de fusão dos híbridos¹⁰³. Foram identificadas até ao momento 20 espécies genómicas (genomoespécies) dentro do género *Leptospira*. Das espécies propostas, 14 são patogénicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans* sensu stricto (s.s.), *L. broomii*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii*; e seis são saprófitas: *L. biflexa* (s.s.), *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L. wolbachii*⁵⁴.

5.3. Abordagem polifásica

Dadas as limitações inerentes aos dois sistemas de classificação, as duas abordagens co-existem e complementam-se, embora não sejam sobreponíveis, ou seja, as características fenotípicas utilizadas para diferenciar *L. interrogans* de *L. biflexa*, no sistema antigénico, não diferenciam as espécies genómicas¹². Por outro lado, a classificação baseada na análise do DNA leptospírico apresenta genomoespécies de *Leptospira* que não correspondem às duas espécies tradicionais (*L. interrogans* e *L. biflexa*), uma vez que a mesma espécie genómica pode conter tanto leptospiros patogénicas como saprófitas⁵².

Assim, o referido método de identificação convencional tem sido incrementado com a introdução de métodos moleculares baseados em técnicas de PCR (*Polymerase chain Reaction*) (cft. ponto 8.1.3.), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), REA (*Restriction Endonuclease Analysis*), PFGE (*Pulsed-Field-Gel-Electrophoresis*), e sequenciação, de modo a obter-se uma identificação mais rápida ao nível do sorogrupo e, quando possível, do sorovar^{14,9,34,41,80,63}.

Recentemente, a utilização de MLST (*Multiple Locus Sequence Typing*) revelou um elevado potencial na caracterização de isolados de *Leptospira* e na partilha de informações epidemiológicas à escala global (<http://leptospira.mlst.net/>)³.

6. Ciclo silvático (reservatórios/hospedeiros e transmissão)

As leptospiros têm nos mamíferos silvestres, em particular, nos roedores, os principais hospedeiros de manutenção ou reservatórios. Estes animais sobrevivem à infecção (por mecanismos de tolerância imunitária), tornando-se assintomáticos e eliminando as leptospiros alojadas nos túbulos renais, por toda a vida, através da urina. Este facto, associado à elevada

capacidade de proliferação dos roedores, bem como à co-habitação com o Homem em ambiente doméstico e peri-doméstico, faz com que estes animais desempenhem um papel fundamental na manutenção e dispersão das referidas bactérias na natureza (**Figura 4**)²⁸.

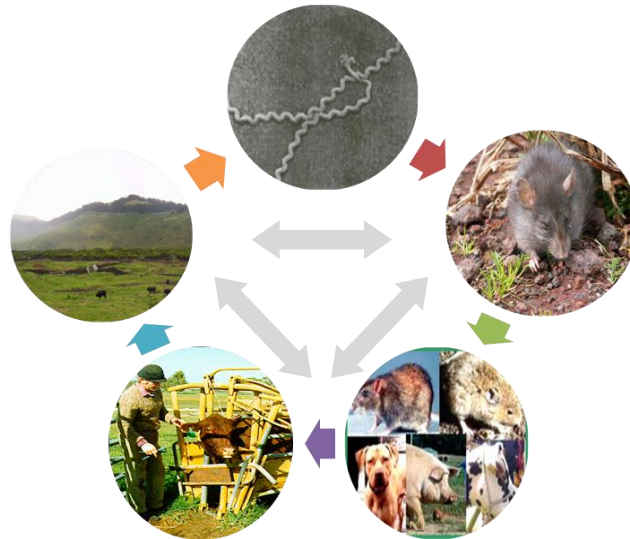


Figura 4. Risco de transmissão de *Leptospira sp.* a potenciais reservatórios e hospedeiros acidentais.

Entre os roedores, destacam-se os murinos dos géneros *Rattus*, *Mus* e *Apodemus*, como principais reservatórios silváticos, mas alguns insectívoros, como o ouriço-cacheiro *Erinaceus europaeus* e o musaranho *Crocidura russula*, parecem ter um papel relevante na dispersão natural de algumas leptospiros. Animais domésticos como canídeos, suínos, bovinos e equinos são igualmente susceptíveis à infecção por *Leptospira*, constituindo uma fonte de infecção para o Homem. Algumas espécies de mamíferos aquáticos, marsupiais, aves reptéis e anfíbios foram igualmente descritos como hospedeiros de leptospiros^{37,101}.

Em princípio, qualquer mamífero pode ser infectado por um dos 260 sorovares da espécie patogénica *L. interrogans* s.l., mas na prática, verifica-se uma relação preferencial de certos sorovares para causar infecção em determinadas espécies animais. Por exemplo, o sorovar Canicola associado aos canídeos domésticos, o sorovar Pomona associado à infecção em

bovinos e suínos e o sorovar Icterohaemorrhagiae associado a roedores da espécie *Rattus norvegicus*¹⁰. No entanto, é fundamental ter em conta que a associação dos sorovares patogénicos com determinadas espécies animais não é exclusiva, podendo variar de região para região devido às diferentes condições ecológicas. Deste modo, o mesmo sorovar pode estar adaptado a mais do que um hospedeiro^{10,92,101}. É de salientar, que a mesma espécie animal pode ser hospedeira de manutenção para alguns sorovares mas ser hospedeira accidental de outros, que causam nesse caso doença grave ou fatal⁵².

A transmissão de leptospirosas entre animais domésticos e silvestres pode ocorrer por via genital, alimentar e, no caso de gestação por via placentar. A mais importante é a via alimentar, através do contacto ou ingestão de água e alimentos contaminados com urina de animais infectados, em particular, dos portadores crónicos³⁷.

A Leptospirose humana está sempre relacionada com uma fonte de contágio animal, sendo a transmissão intra-específica inexistente e a doença considerada globalmente como uma zoonose¹. O contacto accidental com o meio exterior contaminado pela urina dos animais infectados (solo, água e/ou alimentos) constitui a principal causa de infecção por leptospirosas. O contágio pode ocorrer através das mucosas nasal, oral, conjuntival, anal e genital, ou da pele lesionada ou intacta se sujeita a uma exposição prolongada¹⁰¹. A fase de excreção das bactérias pela urina, designada leptospiúria, pode levar semanas, meses ou mesmo anos. Enquanto os animais podem desenvolver uma condição de leptospirose crónica, em que as bactérias crescem e se mantêm nos túbulos renais ou persistem no tracto genital, os humanos sofrem episódios agudos algumas vezes com graves sequelas, mas raramente se comportam como hospedeiros crónicos³⁷.

7. Quadro clínico

A Leptospirose pode assumir duas formas clínicas distintas: a forma anictérica e a forma ictérica. Esta última manifestação, também denominada “Doença de Weil”, é mais grave e por vezes fatal, em cerca de 5 a 10% dos casos⁸¹. Apesar de frequentemente designada por “Leptospirose icterohemorrágica”, dada a sua habitual associação ao sorovar do mesmo nome, pode ser igualmente causada por outros sorovares patogénicos de *L. interrogans* s.l.. Em qualquer das formas é possível delinear duas fases distintas: a fase de leptospirémia ou septicémica e a fase de leptospirúria ou imunológica. Com efeito, após penetrarem no organismo, as leptospiros são disseminadas pela corrente sanguínea e desaparecem gradualmente da circulação, à medida que surgem os anticorpos específicos durante a resposta humoral, após o que se vão alojar em vários tecidos, sendo o rim o órgão de eleição. O período de incubação da doença é de cerca de 7 a 12 dias, podendo atingir os valores extremos de 2 a 20 dias ¹⁰¹ (**Figura 5**).

Na forma anictérica, a fase de leptospirémia dura cerca de 3 a 7 dias e caracteriza-se por um aparecimento súbito de febre elevada, arrepios e dores musculares intensas sobretudo na região lombar e membros inferiores. Na maioria dos doentes, verifica-se também a ocorrência de náuseas, vômitos e dor abdominal. Os sintomas atingem o ponto alto entre o 4º e o 7º dia. Depois de um curto período (1 a 3 dias) sem sintomas, inicia-se a fase de leptospirúria que coincide, em regra, com o aparecimento dos primeiros anticorpos anti-*Leptospira* (classe IgM) e com o início da eliminação de leptospiros pela urina (**Figura 5**). Esta fase dura cerca de 4 a 30 dias, estando presentes sintomas como febre, dores de cabeça e vômitos, mas de modo menos severo. A recidiva da febre, após curta apirexia, desenha o perfil bifásico característico da curva térmica, extremamente sugestivo de Leptospirose. A meningite asséptica é considerada a alteração que melhor caracteriza a reacção imunológica na segunda

fase da doença. Mesmo em algumas situações (cerca de 30%), em que não se verifica a ocorrência de meningite, surgem alterações do líquido, nomeadamente pleiocitose linfocitária e, por vezes, o aumento do nível de proteínas³⁷.

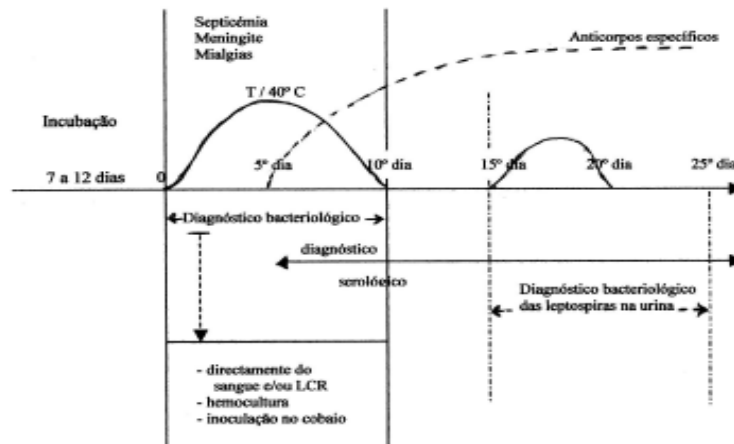


Figura 5. Esquema de evolução da Leptospirose humana (adaptado de Vieira⁹⁷).

No caso ictérico, os sintomas têm geralmente início entre o 3º e o 7º dia da fase de leptospirémia, quando surgem sinais de azotémia e ictérica. A segunda fase envolve, em regra, hepatite aguda, colecistite aguda, colangite e sépsis com ictérica. Podem surgir manifestações hemorrágicas digestivas ou pulmonares graves e, apesar de ocorrer frequentemente disfunção hepática, esta raramente é causa de morte. A lesão renal quando presente manifesta-se por proteinúria, hematúria, oligúria e azotémia¹⁰¹. O carácter bifásico da doença não é tão claro nesta forma de leptospirose. Geralmente, a existência conjunta de um quadro infeccioso agudo com sinais hemorrágicos, ictérica e insuficiência renal, com ou sem síndrome meníngea, é claramente sugestivo da Síndrome de Weil. Podem ainda ocorrer o colapso vascular e alterações da consciência³⁷. É de salientar, que o envolvimento renal se manifesta tanto na forma ictérica como anictérica, mas os sintomas só se evidenciam no

primeiro caso. Contudo, a forma mais frequente de Leptospirose é como uma síndrome gripal, com ou sem sintomatologia respiratória, apresentando por vezes quadros bronquíticos ou broncopneumónicos mais ou menos graves, que justificam a inclusão desta patologia na lista de diagnóstico diferencial das pneumonias atípicas¹⁰¹. Outras doenças como o dengue, a malária, a febre amarela ou a brucelose, apresentam sintomas semelhantes contribuindo para o respectivo sub-diagnóstico. O grau de gravidade da doença humana está particularmente associado ao tipo de sorovar infectante e à concentração do inóculo *versus* porta de entrada no organismo, a par de aspectos relacionados com o hospedeiro, tais como a idade, e o estado nutricional e de saúde do doente infectado por *Leptospira sp.*¹⁰.

8. Diagnóstico laboratorial

Em virtude da inespecificidade dos sintomas clínicos associados a esta patologia, a análise laboratorial é imprescindível na confirmação dos casos de Leptospirose humana. A pesquisa do agente pode ser feita: (1) por exames directos, através da observação microscópica em fundo escuro, da obtenção “*in vitro*” de isolados (cultura) e da detecção do respectivo DNA (tecnologia de PCR), e (2) por exames indirectos, recorrendo a provas sorológicas que permitem a detecção dos anticorpos específicos anti-*Leptospira* em circulação. O método de pesquisa seleccionado, em cada caso, depende fundamentalmente dos dias de evolução da doença, face ao ciclo biológico das leptospiros no organismo, como já referido (*cft.* ponto 7; pág. 17).

8.1. Exames directos (pesquisa do agente)

8.1.1. Microscopia de fundo escuro

Este tipo de pesquisa é indicado nos primeiros dias de evolução da doença (fase de leptospirémia) em amostras de sangue e LCR (líquido cefalorraquidiano), e numa fase mais avançada (fase de leptospirúria) em amostras de urina. Podem ser utilizadas várias técnicas microscópicas no diagnóstico laboratorial de rotina: por observação directa do material biológico a examinar (em fundo escuro) ou após coloração específica, nomeadamente com Vermelho do Congo e precipitação pela prata (em fundo claro), e/ou por imunofluorescência². A microscopia de fundo escuro, é um método simples que permite um resultado imediato, quando desenvolvida por pessoal especializado. A observação do movimento único que caracteriza estes microorganismos pode assegurar um diagnóstico laboratorial positivo. Apresenta, contudo, a limitação de poder dar origem a falsos negativos se o número de bactérias presente na amostra for muito reduzido ou se estas não apresentarem a motilidade característica. O exame microscópico de lâminas coradas com Vermelho do Congo permite observar as bactérias imóveis e incolores em fundo azul. No entanto, este método, apesar de igualmente rápido, não permite uma identificação tão concludente quanto o método anterior. As colorações pela prata (Técnica de Levaditi e Método de Warthin-Starry), mais eficazes, permitem visualizar as leptospiros coradas de castanho-escuro sobre um fundo castanho-claro, mas estão apenas indicadas em preparações líquidas com o mínimo de detritos³⁷. Quanto à técnica de imunofluorescência, a sua aplicação é, em regra, superior à da coloração pela prata, visto permitir uma melhor visualização das leptospiros, especialmente quando presentes em número reduzido, e ser recomendada tanto em preparações líquidas como em tecidos orgânicos. Em dadas regiões, em que já se possui conhecimento prévio acerca dos sorogrupos predominantes, esta técnica possibilita a determinação presuntiva do sorovar ou do sorogrupo

da estirpe infectante⁸¹. Contudo, não é utilizada na rotina, pois apresenta a desvantagem de requerer um equipamento mais sofisticado e de necessitar anticorpos específicos marcados com fluorocromo, que além de difícil aquisição, tornam a técnica muito dirigida, dispendiosa e, por vezes, falível.

8.1.2. Cultura

O isolamento por cultura assegura a identificação da espécie genómica infectante, permitindo estabelecer o diagnóstico definitivo da infecção e fornecendo adicionalmente dados epidemiológicos e profilácticos de interesse regional e nacional, através do reconhecimento dos sorovares patogénicos, dos novos padrões de manifestação clínica, das fontes de contágio e da eficácia das medidas de controlo¹⁰¹. Contudo, este método não é utilizado no diagnóstico laboratorial de rotina, uma vez que: *i)* não permite uma resposta rápida; e *ii)* a sua eficácia depende de certas condições como ausência de antibioterapia no momento de recolha do material biológico para análise, número inicial de organismos viáveis, reduzida autólise tecidular e manipulação imediata do material a cultivar, após a colheita.

O conhecimento do sorovar é essencial em estudos epidemiológicos, para a selecção das leptospiros a utilizar nos testes de diagnóstico, na preparação de vacinas e nos estudos de sensibilidade a antibióticos^{1,52}. O isolamento de leptospiros, a partir de sangue, urina ou tecidos, pode ser obtido por sementeira directa em meio de cultura selectivo ou por inoculação em animais de experiência. O protocolo a realizar varia consoante o tipo de amostra a cultivar e depende da fase da doença. No início da doença, durante a fase leptospirémica, o material de eleição é o sangue; na fase final, cerca de três semanas após o início dos sintomas, durante a fase de leptospirúria, é a urina². Os resultados mais satisfatórios baseiam-se na pesquisa do agente no tecido renal, numa fase mais avançada da doença,

podendo, no entanto, detectarem-se leptospiros no tecido muscular e em órgãos como o fígado, o pulmão, o cérebro e o baço³⁷. A incubação deve ser efectuada no escuro e à temperatura de 28 a 30°C, durante pelo menos 16 semanas ou até visualização de leptospiros, através de observações microscópicas semanais. Após constatação da ocorrência de positividade em meio semi-sólido, suplementado com 5-FU e soro de coelho, e remoção prévia de eventuais contaminantes por filtração, a cultura deve ser repicada para meio líquido e incubada nas condições anteriormente referidas^{22,23}. Uma vez obtida a cultura pura (isolado) em meio líquido, com uma densidade próxima de 10^{6-8} bactérias/ml, esta poderá ser submetida a técnicas de identificação antigénica e molecular.

8.1.3. Técnica de PCR

Este tipo de diagnóstico laboratorial é cada vez mais utilizado em laboratórios de rotina, dada a crescente importância da amplificação do DNA leptospírico em situações de: *i*) atraso ou ausência de resposta humoral ; *ii*) desfecho fatal precoce; e/ou *iii*) surtos epidémicos em que a identificação rápida do agente causal possibilita uma actuação mais eficaz no tratamento da doença e no controlo da(s) respectivas fonte(s) de infecção. Por outro lado, as dificuldades associadas à identificação sorológica dos isolados de *Leptospira sp.* têm promovido a aplicação desta tecnologia na sua identificação molecular. Contudo, nem todos os métodos são igualmente eficazes, diferindo, nomeadamente, no poder discriminatório dos vários níveis taxonómicos.

Em 1993, Gravekamp e colaboradores descreveram uma técnica de PCR baseada na amplificação de um fragmento específico do gene *secY* que permite a identificação de estirpes do complexo *L. interrogans* sensu lato à excepção de *L. kirschneri*³⁹. Esta técnica revelou-se bastante útil quando utilizada na diferenciação preliminar de estirpes de *Leptospira spp* e,

quando aplicada, em conjunto com um segundo par de *primers*, ao diagnóstico clínico de fase precoce^{66,8,13}.

Em 2001, Barocchi e colaboradores descreveram uma técnica de PCR baseada na amplificação de um elemento repetitivo (iRep1) de DNA presente no genoma das leptospiros, identificado a partir de um isolado humano de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, a qual permite a identificação ao nível do sorogrupo⁹. Este método, designado “PCR-iRep1”, tem vindo a ser utilizado como uma ferramenta muito útil, rápida e eficaz na diferenciação molecular de isolados de *Leptospira sp.*⁸⁰.

Outros métodos moleculares, tendo por base uma reacção de amplificação de DNA leptospírico com diferentes sequências oligonucleotídicas iniciadoras (*primers*), têm sido utilizados na identificação de leptospiros^{75,70,14,76,65,55,31}. Mais recentemente, a utilização da PCR em tempo real permitiu obter uma resposta ainda mais rápida no diagnóstico precoce de infecção por *Leptospira*^{53,68}.

NOTA: Na medida em que a aplicação das técnicas de PCR (G1/G2 e iRep1) foi um aspecto dominante na investigação desenvolvida neste trabalho, segue-se uma descrição mais detalhada do respectivo fundamento, principais etapas e componentes da reacção.

8.1.3.1. Fundamento

O fundamento principal da técnica de PCR é o da amplificação de um fragmento específico de DNA, através de ciclos sucessivos com multiplicação exponencial, até que quantidade suficiente do produto seja amplificada de modo a ser visualizado⁹⁶.

8.1.3.2. Etapas

A primeira etapa consiste na **desnaturação** do DNA a uma temperatura elevada (90-95°C), de modo a quebrar as ligações por pontes de hidrogénio que mantêm as duas cadeias unidas. Forma-se, assim, uma cadeia de DNA complementar denominada *template* ou molde, à qual se irão ligar os oligonucleótidos com sequência complementar designados *primers*. Este passo, em que se dá o **emparelhamento** (*annealing*), ocorre a temperaturas mais baixas, em torno dos 50°C, podendo atingir valores mais elevados de acordo com as características dos *primers*⁴. Na terceira etapa de cada ciclo, tem lugar a **síntese** de cadeia complementar por uma polimerase específica, a partir do local de emparelhamento dos *primers*, através da incorporação de desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTP's). Esta fase decorre à temperatura de $\cong 72^{\circ}\text{C}$, sendo a extensão realizada no sentido 5'-3'⁹⁰.

A reacção irá decorrer até que um dos produtos da mistura se acabe ou a enzima perca a capacidade de sintetizar DNA de forma suficientemente rápida. O produto final da reacção exponencial é um fragmento de dupla cadeia de DNA cujas extremidades são definidas entre os *primers*. O número de ciclos requeridos para uma amplificação óptima varia em função da quantidade de DNA inicial e da eficiência de cada etapa⁴.

8.1.3.3. Componentes da reacção

DNA polimerase

A DNA polimerase frequentemente utilizada é a *Taq* polimerase isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*. Esta enzima faz elongação dos *primers*, usando como molde a cadeia a que cada *primer* está emparelhado⁹⁶. A respectiva actividade aumenta na transição de 65°C para 72°C, sendo a temperatura do ensaio crucial na optimização do processo⁹⁰.

Desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP's)

Os dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) podem ser obtidos na forma liofilizada ou em soluções aquosas neutralizadas. Os vários ciclos de polimerização implicam uma quantidade ideal de dNTP's, podendo o excesso ter consequências negativas ao nível da especificidade⁴.

Tampão e Catiões divalentes

O tampão a adicionar à mistura deverá ser o indicado para o funcionamento óptimo da enzima em uso. A variação da concentração de cationes divalentes na reacção é uma estratégia simples, mas com efeitos significativos na optimização da técnica de PCR⁹⁰. Em regra, são utilizados iões Mg^{2+} (1,0 - 1,5 mM), os quais não só aumentam a interacção dos *primers* com a cadeia molde de DNA, como são necessários à actividade da DNA polimerase e à incorporação dos dNTP's. **Nota:** Em alguns casos poderá ser necessária a adição de determinados componentes à mistura de reacção (aditivos), como o Tween 20 ou a Albumina Sérica Bovina, de modo a incrementar a sua eficiência⁴.

Primers

Existem determinados aspectos que contribuem para a obtenção de pares de *primers* mais eficientes *i)* o conteúdo G+C deve ser similar entre eles; *ii)* devem possuir número de bases

idêntico e; devem *iii*) apresentar baixa complementaridade entre si, particularmente na região 3' (resíduo de Guanina ou Citosina)^{4,90}.

DNA alvo

A preparação das amostras de DNA a serem analisadas deverá ser de fácil execução e com um número mínimo de etapas, de modo a reduzir as hipóteses de contaminação. Actualmente, estão disponíveis no mercado kits de extracção e purificação de DNA para os mais diversos microorganismos, podendo ser aplicados a vários tipos de amostras biológicas. Outros métodos de extracção mais simples, como o método tradicional por fervura (a 96°C) ou o método do fenolclorofórmio, são frequentemente utilizados.

8.2. Exames indirectos (pesquisa de anticorpos específicos anti-*Leptospira*)

Dadas as inúmeras dificuldades e limitações das técnicas bacteriológicas, são as reacções sorológicas a principal prova específica do diagnóstico laboratorial. Referem-se, em seguida, as duas técnicas utilizadas no imunodiagnóstico actual da Leptospirose, na Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (ULBL/IHMT).

8.2.1. Técnicas de rastreio (e.g., Teste de Aglutinação Macroscópica)

O Teste de Aglutinação Macroscópica sobre lâmina é efectuado como um teste de rastreio dos soros duvidosos e positivos para a Leptospirose, tendo por base uma reacção antígeno-anticorpo por aglutinação visível a olho nú (**Figura 6**). Consiste na observação de reactividade de uma gota do soro problema com igual volume de um antígeno inactivado,

muito estável e genoespecífico, constituído por uma ou mais estirpes isoladas localmente, de forma a aumentar a sensibilidade da técnica. Os soros positivos deverão ser posteriormente analisados pela técnica de referência (TAM) de modo a confirmar a respectiva reactividade, dado que podem ocorrer falsos positivos. Esta técnica de rastreio apresenta a vantagem de permitir analisar um número elevado de amostras com menos custos em tempo, material e reagentes. Acresce ainda o facto de poder ser implementada em áreas em que não existe um laboratório de referência, desde que esteja assegurada a qualidade do antígeno. Contudo, o seu uso é apenas indicado quatro a cinco dias após o início dos sintomas, aquando da formação dos primeiros anticorpos específicos.

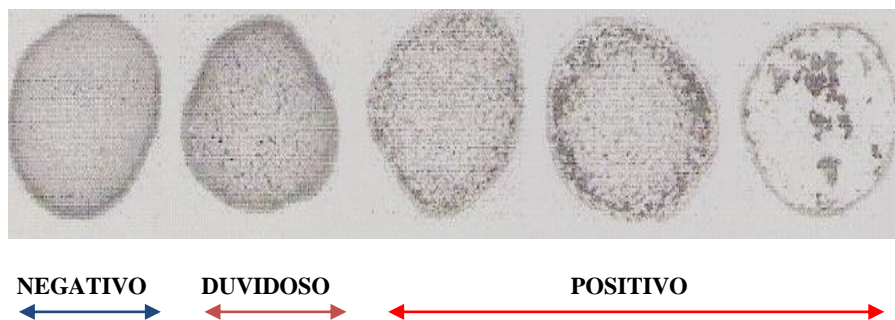


Figura 6. Representação esquemática do teste sorológico de rastreio da Leptospirose: técnica de aglutinação macroscópica sobre lâmina, cujo resultado se obtém em cerca de 4 minutos. (fonte: protocolo da ULBL/IHMT).

8.2.2. Técnica de referência (Teste de Aglutinação Microscópica)

A Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) é considerada a técnica de referência para o diagnóstico da Leptospirose, sendo o **único método de rotina que permite, por si só, a identificação do sorogrupo presuntivo da estirpe infectante**. Consiste, tal como a técnica de aglutinação macroscópica, na observação de uma reacção “antígeno-anticorpo” por

aglutinação, mas apenas visível em microscopia de fundo escuro. É efectuada em microplacas de fundo plano, utilizando soros diluídos numa ou duas diluições iniciais, na fase de rastreio e, posteriormente em diluições seriadas ao dobro com os antigénios “vivos” de referência reactivos (culturas com 4 a 14 dias de idade e densidade aproximada de 10^8 bactérias/ml). A amostra problema é considerada positiva quando 50% ou mais das leptospiras estão aglutinadas, em regra, a partir da diluição mínima de 1:100 (**Figura 7**). Além dos sorogrupos de referência, é conveniente incluir na bateria de antigénios a utilizar, estirpes isoladas localmente, de modo a aumentar a sensibilidade da técnica. Embora sejam feitos esforços no sentido de substituir esta técnica por um teste de diagnóstico mais rápido, não dependente de uma resposta imune, e que não implique a manutenção de um elevado número de estirpes em cultura, esta continua a manter-se como a técnica de referência para o diagnóstico da Leptospirose.

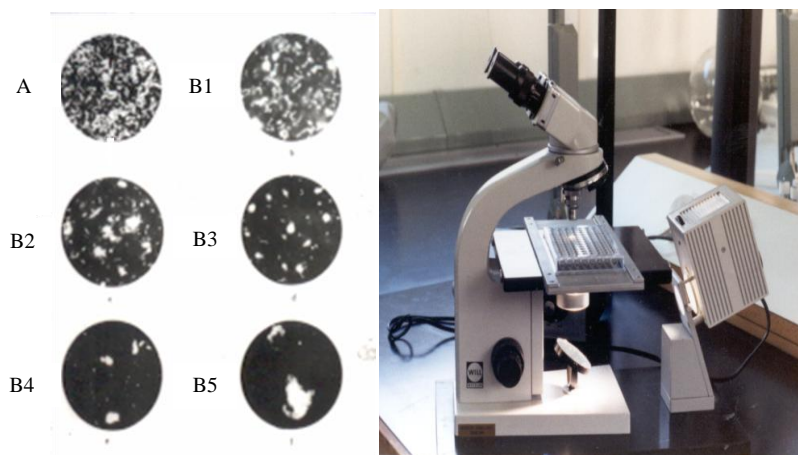


Figura 7. Técnica de aglutinação microscópica (TAM). A-Testemunha; B1-B5 intensidade crescente de aglutinação: B1 (75% livres); B2 (50% livres); B3 (25% livres); B4-B5 (\cong 0% livres) (adaptado de Collares-Pereira²²).

Em virtude do aparecimento de imunoglobulinas IgM, na fase inicial da doença, seguido do aparecimento mais tardio de imunoglobulinas IgG, mais específicas, é conveniente basear

o resultado da sorologia em amostras séricas emparelhadas, colhidas com um intervalo mínimo de 10 dias, sendo a primeira colheita efectuada de preferência na fase inicial da doença, de modo a poder analisar-se a cinética dos anticorpos específicos e, consequentemente, confirmar o sorogrupo presuntivo da estirpe infectante. Com efeito, a interpretação da sorologia no início da doença pode ser dificultada pela existência de reacções cruzadas, paradoxais ou residuais, inerentes à detecção de antígenos comuns aos diferentes sorovares (ditos “específicos de género”)^{22,23}.

9. Tratamento e prevenção

A antibioterapia deverá ser iniciada após confirmação laboratorial do diagnóstico clínico ou, imediatamente, no caso de forte suspeita clínica e/ou epidemiológica de um caso grave de Leptospirose, através da administração preferencial de penicilina G por via endovenosa. Além deste fármaco, outros antibióticos como o ceftriaxone, a cefotaxima e a doxiciclina poderão ser utilizados^{69,88}. A doxiciclina poderá ser administrada com fins profilácticos em grupos de risco em áreas onde existe elevada prevalência da doença ou como prevenção em situações de visita a áreas problemáticas^{82,99,101}. Além do uso de antibióticos, deve assegurar-se o reequilíbrio hidroelectrolítico dos doentes e, em casos de insuficiência renal aguda, deverá proceder-se ao controlo dietético e à hemodiálise¹⁰¹.

Como medidas de prevenção “ambiental” destacam-se a identificação das áreas e grupos de risco, as campanhas de desratização, o melhoramento das condições sanitárias e dos hábitos de higiene, o uso de vestuário protector como luvas e botas de borracha em indivíduos expostos a possíveis fontes de contágio, a realização de campanhas de sensibilização junto das populações, e o tratamento e vacinação dos efectivos pecuários.

No que se refere à Leptospirose humana, já foram implementados com sucesso, na China, Japão e Vietname, programas de vacinação em grupos populacionais mais susceptíveis de contrair a doença^{1,19}. A aplicação destas vacinas é contudo bastante limitada, dado que, para apresentarem resultados satisfatórios têm de ser altamente específicas para os sorovares predominantes em cada região, implicando elevados custos de produção e de investigação epidemiológica, nem sempre rentáveis do ponto de vista económico¹⁰⁰.

As vacinas contêm, em regra, dois ou mais sorovares, predominantes numa determinada área, sendo a revacinação anual recomendada para a manutenção da imunidade pois, tal como na infecção natural, a imunidade vacinal é restrita no tempo e aos sorovares envolvidos¹. Embora seja possível a manutenção prolongada da imunidade específica (*i.e.*, ao mesmo sorovar), verificou-se ser possível a reinfecção pelo mesmo ou por um sorovar distinto³⁷.

Actualmente, a única vacina com licença para uso humano está a ser produzida em Cuba^{99,56}. No entanto, a China, a par da França, já esteve envolvida na produção e utilização de uma vacina com esse fim¹⁰². Vacinas comerciais “anti-Leptospirose” estão globalmente disponíveis para os bovinos, suínos e canídeos domésticos. Contudo, tal como no caso dos humanos constata-se que a vacinação é apenas parcialmente efectiva e deverá ser efectuada periodicamente de acordo com as indicações do médico veterinário.

A existência de um elevado número de sorovares, com diferenças em termos de abundância relativa e distribuição geográfica, tem dificultado o desenvolvimento de uma vacina eficaz a nível mundial¹⁰⁰. Por outro lado as leptospiras desenvolveram meios altamente específicos de evasão aos mecanismos de defesa imunitária do hospedeiro. Até à data a investigação vacinal tem vindo a basear-se no estudo de lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, proteínas da membrana externa, potenciais factores de virulência e mais recentemente, no desenvolvimento de vacinas de DNA^{99,100}. Contudo, os avanços na produção

de uma vacina eficaz dependerão da compreensão exacta dos mecanismos envolvidos na imunidade adquirida^{59,100}.

Parte II

Caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira sp.* e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos na ilha de São Miguel, Açores.

Parte II. Caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira sp.* e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos na ilha de São Miguel (Açores)

1. Objectivos do estudo

a) Caracterizar, do ponto de vista molecular e antigénico, os primeiros isolados de *Leptospira sp.* obtidos de doentes, com diagnóstico clínico de Leptospirose, admitidos no Serviço de Urgência do Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada (HDESPD), na ilha de São Miguel;

b) Proceder à diferenciação molecular de estirpes patogénicas do género *Leptospira* isoladas de roedores (murinos) capturados em São Miguel, enquanto reservatórios silváticos de eleição destas espiroquetas; e

c) Analisar a resposta imunológica humoral à infecção por *Leptospira*, nos doentes com hemocultura positiva, e em roedores com e sem isolado leptospírico renal.

2. Justificação do estudo

Nos Açores, embora se admitisse a ocorrência da doença na população humana, pela existência de quadros clínicos compatíveis com a Síndrome de Weil (a forma ictérica e mais severa da doença), só no final da década de oitenta e princípio da década de noventa, foram publicados os primeiros trabalhos sobre a Leptospirose humana e bovina^{5,21,79}. Os primeiros estudos microbiológicos nos roedores, considerados os principais responsáveis pela disseminação das leptospiras na natureza, foram efectuados em seis das nove ilhas do

Arquipélago entre 1993 e 1996^{25,26,27,28}. Nos últimos anos, a doença foi considerada um problema de saúde pública de importância crescente, em particular, nas ilhas de São Miguel e Terceira, face ao aumento do número de casos, por vezes fatais^{30,98}. Contudo a Leptospirose humana não tem sido alvo de uma investigação detalhada nestas duas ilhas e embora os últimos estudos nos reservatórios silváticos, efectuados por Collares-Pereira e colaboradores em 2000²⁵, tenham permitido a obtenção de algumas informações sobre os sorovares patogénicos predominantes, mantém-se a necessidade de uma avaliação integrada dos factores de risco de transmissão dos agentes de doença na população humana, para uma vigilância e controlo eficazes desta zoonose.

Por último, e na medida em que a gravidade da infecção está directamente relacionada com os agentes bacterianos em circulação, um conhecimento mais detalhado das estirpes mais prevalentes irá providenciar medidas de actuação mais adequadas, não só em termos terapêuticos como, em particular, na optimização dos testes de diagnóstico. Por sua vez, o estudo da resposta humoral, nos doentes em que foi possível isolar o agente infeccioso e nos roedores da ilha, providenciará informações acerca da identidade presuntiva dos sorogrupos das estirpes infectantes e o estudo adicional da especificidade da resposta imune e das interacções bactéria-hospedeiro de manutenção.

As actividades desenvolvidas decorreram no âmbito do projecto “Epidemiologia e Controlo da Leptospirose nos Açores (2004-2008)”, financiado ao abrigo do Acordo de Cooperação e Defesa entre Portugal e os Estados Unidos da América (*Scientific Cooperative Agreement No. 58-4001-3-F185*).

3. Material e Métodos

3.1. Material biológico

3.1.1. Culturas de referência e isolados nacionais de *Leptospira sp.*

Culturas jovens (4 a 10 dias) e densas (10^8 bactérias/ml) das estirpes de referência e dos isolados nacionais pertencentes à Leptospiroteca da ULBL/IHMT (**Tabela 2**, pág. 37) foram utilizadas como antígenos “controlo” nos testes de identificação antigénica e molecular, e como antígenos na técnica de aglutinação microscópica.

3.1.2. Isolados de *Leptospira* e soros de doentes internados no Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada

De um total de 68 hemoculturas realizadas no Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada (HDESPD), entre Fevereiro de 2006 e Dezembro de 2008 (uma por doente em meio semi-sólido de EMJH), obtiveram-se 10 (14,7%) isolados de *Leptospira sp.* que, após adaptação “*in vitro*”, constituíram um dos objectos de estudo do presente trabalho. Aos referidos isolados foi atribuída uma designação alfa-numérica (AzHuL01-AzHuL10). Paralelamente, estudou-se um total de 26 amostras de soro, com diferentes dias de evolução após admissão hospitalar, obtidas dos dez doentes com hemocultura positiva.

3.1.3. Isolados de *Leptospira* de roedores capturados em São Miguel

Duzentos e cinquenta e sete (43,8%) isolados de *Leptospira sp.* provenientes de um total de 587 murinos com cultura positiva capturados na Ilha de São Miguel (Nov./2005 - Out./2006), ao abrigo do Projecto de Investigação da Leptospirose nos Açores, foram submetidos a caracterização molecular por PCR com os *primers* G1/G2 e iRep1 (N=257;

100%), e sequenciação (N=21; 8,2%), no decurso do presente trabalho. Os animais analisados correspondem a 988 capturas efectuadas no âmbito de dois objectivos específicos do referido projecto: *i*) avaliação da abundância relativa e taxas de infecção por *Leptospira*, em toda a superfície da ilha (Estudo Horizontal); e *ii*) avaliação da demografia, estrutura da população e taxas de infecção por *Leptospira*, em habitats seleccionados (Estudo Vertical). Na presente investigação, os animais foram registados segundo o tipo de estudo: H (Horizontal) e V (Vertical).

3.1.4. Soros de roedores capturados em São Miguel

A pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira*, pela técnica de referência (TAM), foi efectuada em 535 soros de roedores, em particular do Género *Rattus* (98,7%), com a seguinte distribuição: 244 (45,6%) animais com cultura negativa para *Leptospira* e 291 (54,4%) com exame cultural positivo. Destes últimos, 128 pertenciam a animais cujo isolado bacteriano foi analisado no âmbito deste estudo (*cft.* ponto 3.1.3.: 128/257; 49,8%). A reduzida percentagem de *Mus musculus* analisados por sorologia ficou a dever-se, não só à dificuldade técnica de recolher-se sangue desta espécie como à ausência do volume necessário para o respectivo exame. As amostras de soro foram mantidas a -20°C até à realização da TAM.

Tabela 2. Lista dos antígenos (estirpes de referência e isolados nacionais), pertencentes à Leptospireteca da ULBL/IHMT, que foram utilizados nos testes de identificação antígenica e molecular, e/ou na técnica de aglutinação microscópica.

Sorogruppo (<i>L. interrogans</i> s.l.)	Sorovar	Estirpe
Australis	Australis	Ballico
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
Ballum	Ballum	Mus 127
Ballum	Arborea	Arborea ^(a)
Ballum	Castellonis	Castellon 3
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Grippothyphosa	Grippothyphosa	Moskva V
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA ^(b)
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20 ^(c)
Javanica	Poi	Poi
Mini	Mini	Sari
Panama	Panama	CZ 214
Pomona	Pomona	Pomona ^(d)
Pomona	Mozdok	5621
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Sejroe	Sejroe	M 84
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
Sejroe	Saxkoebing	Mus 24
Sejroe	Wolffi	3705
Tarassovi	Tarassovi	Mitis Johnson
Semarang*	Patoc	Patoc 1
<i>Leptospira inadai</i>	Isolado de uma doente Portuguesa, com estatuto de patogenicidade intermédia (Lisboa, 1998)	
<i>Leptospira interrogans</i> s.s.	AzTRoPu74 ^(e)	AzTRoH91 ^(f)
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	AzSMRoS130 ^(g)	AzSMRoS184 ^(h)

* Sorogruppo saprófita (complexo *L. biflexa* sensu lato); **(a)** Isolado de roedor (*Mus musculus*, Terceira, Açores, 1993); **(b)** Isolado de roedor (*Rattus norvegicus*, Terceira, Açores, 1993); **(c)** Isolado de insectívoro (*Erinaceus europaeus*, São Miguel, Açores, 1993); **(d)** Isolado de roedor (*Mus spretus*, Montemor-o-Velho, 1993); **(e)** Isolado de roedor (*Rattus rattus*, Terceira, 2005); **(f)** Isolado de roedor (*Rattus norvegicus*, Terceira, 2005); **(g)** Isolado de roedor (*Mus musculus*, São Miguel, 2006); **(h)** Isolado de roedor (*R. rattus*, São Miguel, 2006)

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção e identificação dos isolados humanos de *Leptospira* sp.

3.2.1.1. Colheita de sangue e preparação das hemoculturas no HDESPD

As 68 hemoculturas de doentes admitidos no Serviço de Urgência do HDESPD, com forte suspeita clínica e epidemiológica de Leptospirose, foram realizadas por sementeira directa em meio semi-sólido EMJH (Difco®). A colheita de sangue foi efectuada no dia da admissão hospitalar e antes do início da antibioterapia. As amostras de sangue total ($\cong 2$ ml) foram recolhidas “à cabeceira do doente” para um frasco de hemocultura pediátrico e processadas de acordo com o protocolo em anexo (*cft.* **Anexo I**). A sementeira para o meio definitivo foi efectuada pela Técnica de Análises Clínicas do Serviço de Patologia Clínica do HDESPD, à qual foi dada formação específica. Os tubos resultantes de cada hemocultura processada foram sendo enviados para a ULBL/IHMT, para incubação com agitação orbital a 30°C, e observação macroscópica diária e microscópica semanal (em fundo escuro), de modo a confirmar-se a presença de crescimento bacteriano e/ou eliminar eventuais contaminantes (através de filtração e/ou passagens seriadas para novo tubo com “meio fresco”).

3.2.1.2. Isolamento e manutenção *in vitro* dos isolados humanos

A identificação molecular e antigénica das estirpes isoladas implicou, numa primeira etapa, a respectiva adaptação “*in vitro*”, através de passagens sucessivas em meio de EMJH, semi-sólido e líquido, por vezes requerendo a adição de soro de coelho previamente filtrado e inactivado a 56°C (*cft.* **Anexo II**). Após adaptação das estirpes, o passo seguinte foi a produção de culturas jovens (4 a 10 dias) e densas (10^8 bactérias/ml) de cada um dos isolados a identificar, para posterior utilização. As respectivas densidades foram determinadas

recorrendo a uma câmara de Petroff-Hauser e a esterilidade foi confirmada por microscopia de fundo escuro e sementeira em caldo simples (pelo menos, 72 horas a 37°C) (*cft.* **Anexo II**).

3.2.1.3. Análise antigénica

Uma vez obtidos os isolados humanos a identificar nas condições referidas (ponto 3.2.1.2.), procedeu-se a uma primeira caracterização fenotípica, com base no comportamento das leptospiras a 13°C e a \cong 30°C, e na presença da 8-azaguanina (225 µg /ml) e do NaCl (1M) (*cft.* **Anexo III**). Em todos os ensaios foram incluídas duas estirpes de referência, uma saprófita (Patoc 1, sorovar Patoc) e a outra patogénica (M20, sorovar Copenhageni), de modo a obter-se uma primeira diferenciação do respectivo estatuto “patogénico”.

3.2.1.3.1. Anti-soros de referência hiperimunes (estatuto de sorogrupo)

A identificação dos isolados humanos, ao nível do sorogrupo foi desenvolvida com base na respectiva aglutinação microscópica (pela técnica de referência, TAM) com anti-soros de referência hiperimunes (produzidos em coelho) e representativos dos sorogrupos predominantes em doentes Açorianos com diagnóstico de Leptospirose (*cft.* **Anexo IV**). Sumariamente, a TAM foi efectuada em microplacas de fundo plano e baseou-se na reacção dos anti-soros hiperimunes em diluições seriadas ao dobro com os antígenios (isolados humanos) a identificar, para detecção do título final. Os resultados da microscopia (em fundo escuro) foram registados segundo a percentagem de leptospiras livres/aglutinadas para cada título observado por anti-soro reactivo (*cft.* **Anexo IV**).

3.2.1.3.2. Anticorpos monoclonais (estatuto de sorovar)

A identificação dos isolados humanos ao nível do sorovar foi efectuada com base num primeiro painel de anticorpos monoclonais (mAbs) que aglutinam especificamente com os sorovares dos sorogrupos identificados anteriormente pelos soros hiperimunes: Icterohaemorrhagiae (F12C3, F52C1, F70C7, F70C14, F70C24, F89C12) e Ballum (F74C1, F74C4 e F74C7). O procedimento efectuado, incluindo a leitura dos resultados, baseou-se no protocolo de referência da TAM, em microplaca de fundo plano (*cft.* Anexo IV). No caso dos isolados do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, o painel foi alargado a um total de 18 mAbs para confirmação dos resultados obtidos, face à dificuldade em diferenciar os dois sorovares dominantes, Copenhageni e Icterohaemorrhagiae. Este estudo complementar foi desenvolvido no Laboratório de Referência de Leptospiras do *Royal Tropical Institute* (KIT), em Amsterdão, sob a responsabilidade do Dr. Rudy Hartskeerl.

3.2.1.4. Análise molecular

3.2.1.4.1. Extracção e purificação de DNA

A primeira etapa para a caracterização molecular dos isolados humanos consistiu na extracção e purificação do seu DNA. Para o efeito foram utilizados respectivamente dois procedimentos distintos, o método de fervura a 96°C e um método comercial (Gentra[®]), como a seguir se descreve.

Método de Extracção de DNA por fervura a 96°C

Este método foi utilizado, na extracção do DNA, partindo de um volume inicial de 1 ml de suspensão bacteriana com uma densidade mínima igual a 10⁸ bactérias/ml. A amostra foi

centrifugada a 13.000 g durante 15 minutos à temperatura ambiente, após o que se removeu o sobrenadante e ressuspendeu o sedimento em 100 µl de água autoclavada. A amostra foi novamente centrifugada a 13.000 g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Eliminou-se o sobrenadante e resuspenderam-se de novo as células em 100 µl de água autoclavada. Procedeu-se à última centrifugação nas condições anteriormente referidas e, após eliminação do sobrenadante, a ressuspensão foi efectuada em tampão TE (*cft.* **Anexo VI**). A lise das células foi efectuada num termobloco a 96°C durante 10 minutos sendo as amostras armazenadas a 4°C ou -20°C, até análise posterior (sequenciação e/ou PCR).

Método comercial de extracção e purificação de DNA

A extracção e purificação do DNA utilizando este método foi executada em conformidade com as especificações do fabricante (Gentra[®]), ainda que tenham sido introduzidas pequenas alterações, nomeadamente nos tempos de centrifugação, incubação, evaporação do etanol e hidratação do DNA. Essas alterações decorreram da optimização e adaptação do protocolo à realidade do laboratório (*cft.* **Anexo V**).

De uma forma sucinta, a extracção consistiu numa primeira etapa de lise celular com um detergente aniónico na presença de um estabilizador de DNA. O RNA foi removido pela acção da RNase e outros contaminantes como proteínas foram removidos por precipitação de sais. Finalmente, o DNA genómico recuperado por precipitação com etanol foi dissolvido numa solução tamponada. Após extracção, as amostras de DNA foram armazenadas a 4°C ou -20°C até análise posterior (sequenciação e/ou PCR).

Nota: O DNA da totalidade dos isolados humanos e murinos submetidos a identificação molecular no âmbito deste trabalho (N=10 e N=257, respectivamente) foi extraído pelos dois métodos referidos. Garantiu-se deste modo a existência de um “stock” de DNA (com

diferente grau de pureza e concentração) de cada isolado a identificar em futuros estudos moleculares. A par dos isolados em análise foram também sujeitas a repicagem em meio selectivo e extracção de DNA, pelas duas abordagens, as estirpes de referência mais prevalentes nos Açores, assim como estirpes da bateria representativas dos diversos sorogrupos, que serviram de “padrão” nas amplificações do DNA (PCR-G1/G2 e PCR-iRep1). Em cada ensaio, foram incluídas e sujeitas ao procedimento de extracção em curso, duas amostras de água destilada, às quais foi atribuída a designação de controlos negativos de 1º nível.

3.2.1.4.2. Aplicação da Técnica de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)

- **PCR-G1/G2 (diferenciação do estatuto de isolado patogénico)**

A confirmação molecular do estatuto patogénico dos isolados humanos foi efectuada numa primeira fase recorrendo à técnica de PCR com os *primers* G1 e G2 (**Tabela 3**, pág. 43). Este método permite a amplificação de um fragmento específico de 285 pb em todas as estirpes pertencentes ao complexo *Leptospira interrogans* sensu lato, com a excepção de *L. kirschneri*³⁹. As reacções foram efectuadas de acordo com o protocolo descrito por Gravekamp *et al.* e adaptado pela *World Health Organization* (WHO) em 2003^{39,101}. Para uma reacção final de 50 µl em água autoclavada, foram adicionados os seguintes componentes: 1 x PCR *buffer* (Bioline®), 3 mM MgCl₂ (Bioline®), 100 mM dNTP's (Bioline®), 1 µM de cada *primer* (Invitrogen®), 1 U *Taq* DNA polimerase (Bioline®) e 1,5-2,5 µg de DNA da amostra a amplificar. Os componentes da mistura de reacção à excepção do DNA foram adicionados, num tubo único de 1,5 ml estéril, numa câmara de fluxo laminar previamente esterilizada para o efeito. Em cada ensaio considerou-se o número de amostras a testar, os dois controlos negativos de 1º nível (extracção de DNA) e os dois controlos negativos de 2º

nível (PCR). Para evitar possíveis erros associados à pipetagem e/ou à calibração das micropipetas, a mistura foi preparada em excesso, considerando as amostras anteriormente mencionadas mais uma. O passo seguinte consistiu na distribuição de 40 µl da mistura de reacção por cada microtubo de 0,2 ml esterilizado e previamente identificado, tendo sido também adicionados 10 µl de água autoclavada aos tubos que serviram em cada ensaio como controlos negativos de 2º nível. Numa câmara de fluxo laminar distinta, adicionaram-se, posteriormente, 10 µl de cada amostra de DNA a amplificar aos respectivos microtubos de 0,2 ml (incluindo os controlos negativos de 1º nível). O passo final consistiu na colocação dos tubos com a mistura de reacção completa num termociclador automático (Bio-Rad®) programado de acordo com as condições descritas por Gravekamp *et al.*³⁹ (**Tabela 4**).

Tabela 3. Sequências dos *primers* G1 e G2 com indicação do tamanho do fragmento amplificado e das regiões do gene *secY* em que ocorre o *annealing*³⁹.

Gene	Primer	Nucleótidos	Sequência	Fragmento
<i>secY</i>	G1	[1-20]	forward 5'- CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT-3'	285 pb
	G2	[266-285]	reverse 5'- GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG-3'	

Tabela 4. Etapas do processo de amplificação de DNA pelo PCR com os *primers* G1 e G2³⁹.

Gene	Nº de ciclos	Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
<i>secY</i>	1º ciclo	Desnaturação inicial	94	3
		Desnaturação	94	1
	34 ciclos	Emparelhamento	55	1,5
		Extensão	72	2
		Extensão	72	10

- **PCR-iRep1 (diferenciação ao nível do sorogrupo)**

A diferenciação molecular dos isolados ao nível do sorogrupo foi desenvolvida, com base numa técnica de PCR com um *primer* único, designada PCR-iRep1, que permite a

amplificação de um elemento repetitivo no genoma das estirpes de *Leptospira*. O protocolo de PCR utilizado baseou-se no descrito por Barocchi e colaboradores em 2001, com a introdução de algumas alterações no que se refere às concentrações de DNA, do *primer*, dos DNTP's e do cloreto de magnésio. Para uma reacção final de 50 µl em água autoclavada, foram adicionados: 1 a 2 µg de DNA de cada um dos isolados a identificar, 250 pmol do *primer* iRep1 (5'GCG GAC TCA TAC CCG CT 3') (Invitrogen®), 5 mM MgCl₂ (Bioline®), 1 X PCR *buffer* (Bioline®), 250 µM de cada desoxinucleósido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Bioline®) e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Bioline®). A especificidade do *primer* foi testada num ensaio em triplicado em que se utilizou 1 a 2 µg de DNA da espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. A quantificação do DNA a utilizar nas reacções de PCR foi efectuada com recurso a um espectrofotómetro (SmartSpec Plus Spectrophotometer- Bio-Rad®). A preparação das reacções e a adição das amostras foram efectuadas em câmaras de fluxo laminar distintas previamente esterilizadas para o efeito conforme descrito para o PCR- G1/G2 (*cft.* página 42). O passo final consistiu na colocação dos tubos com a mistura da reacção completa num termociclador automático (Bio-Rad®) programado de acordo com as condições descritas por Barocchi *et al.*⁹ (**Tabela 5**). O DNA da totalidade dos isolados e estirpes de referência analisadas foi sujeito a amplificação pelo PCR-iRep1 em triplicado.

Tabela 5. Etapas do processo de amplificação de DNA pelo PCR-iRep1⁹.

Nº de ciclos	Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
Passo inicial	Desnaturação	94	5
	Desnaturação	94	0,5
35 ciclos	Emparelhamento	50	1,5
	Extensão	72	4
Passo final	Extensão	72	7

- **Electroforese em gel de agarose**

Os produtos amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose (Citomed[®]) a 2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml-Sigma[®]). O procedimento efectuado foi o seguinte: dissolveram-se 2 g de agarose em 100 ml de tampão TAE (**Anexo VI**). A mistura foi aquecida no microondas durante cerca de 2 minutos (até ferver). Seguidamente, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente durante 10 segundos e adicionaram-se 5 µl de brometo de etídio (EtBr) (Sigma[®]). Depois de homogenizar, verteu-se o líquido num suporte de plástico próprio no qual se colocou um pente e deixou-se solidificar ao ar durante cerca de 15 minutos. O gel foi posteriormente colocado numa tina de electroforese com Tampão TAE (**Anexo VI**) e aplicaram-se as amostras nos vários poços, adicionando 2 µl de *loading buffer* (**Anexo VI**) a 8 µl de cada uma das amostras. A corrente eléctrica aplicada foi de 125 volts (V) durante 35 minutos, no caso dos produtos amplificados pelo PCR G1/G2, e de 120 V durante uma hora, para o PCR-iRep1. A visualização dos produtos amplificados foi realizada num transiluminador ultravioleta (Wealtech[®]) equipado com um sistema que permitiu o respectivo registo fotográfico. Em cada corrida foi aplicado um marcador com diferentes pesos moleculares [100-1000 pb (Bio-Rad[®]); 100-2000 pb (Bioline[®]); ou 100-3000 pb (Bio-Rad[®])], que possibilitou a identificação dos fragmentos de DNA obtidos.

3.2.1.4.3. Sequenciação

O DNA dos dez isolados humanos de *Leptospira* spp, obtido pelos métodos de extracção (comercial ou fervura), foi enviado para o Laboratório de Referência de Leptospiras do *Royal Tropical Institute*, em Amsterdão, para análise por sequenciação. Neste processo, um

fragmento de 245 pares de bases (pb) do gene *secY*, flanqueado pelos *primers* G1 e G2 foi amplificado e subsequentemente sequenciado como descrito por Victoria *et al.*⁹⁵.

3.2.2. Obtenção e identificação dos isolados murinos de *Leptospira sp.*

3.2.2.1. Colheita do rim e preparação das culturas na DGPC

Esta fase do trabalho, relativa às necrópsias e recolha/preparação dos rins dos roedores silváticos capturados na ilha de São Miguel, entre Novembro de 2005 e Outubro de 2006, foi efectuada pelos técnicos da Direcção Geral de Protecção de Culturas (DGPC) da referida ilha, aos quais foi dada formação específica. A metodologia adoptada é a descrita no **Anexo VII**.

3.2.2.2. Isolamento, manutenção *in vitro* e armazenamento dos isolados

Após sementeira do macerado de rim previamente diluído, para o meio semi-sólido de EMJH (*cft.* **Anexo VII**), as culturas foram enviadas para a ULBL/IHMT em Lisboa onde se procedeu à incubação, observação microscópica e adaptação “*in vitro*” das estirpes isoladas. Após passagens sucessivas em meio de EMJH foram congeladas várias alíquotas a - 80°C, por cada isolado obtido, no sentido de garantir a respectiva conservação e relançamento em estudos posteriores, como os inerentes à presente investigação.

3.2.2.3. Recuperação dos isolados para identificação molecular

As 257 estirpes submetidas a análise molecular no âmbito deste trabalho foram descongeladas à temperatura ambiente e inoculadas em meio de EMJH semi-sólido com 5-FU (200 µg/ml) e soro de coelho (2%). Após (re)adaptação ao meio de cultura (confirmada pela

observação microscópica de uma densidade bacteriana óptima), as leptospiras foram sendo gradualmente repicadas para tubos contendo EMJH líquido e incubadas com agitação orbital à temperatura de 30°C. As estirpes apresentaram períodos de recuperação *in vitro* de maior (\cong 30 dias) ou menor (\cong 10 dias) duração, dependendo do estado de conservação (número de bactérias viáveis pós-descongelação), do número da passagem e/ou do tipo de meio de cultura aquando da congelação do isolado.

3.2.2.4. Testes de identificação molecular (PCR-G1/G2; PCR-iRep1 e sequenciação)

Dada a dimensão da amostra e atendendo às já reconhecidas dificuldades dos métodos convencionais de identificação das leptospiras, implementaram-se as já referidas técnicas de PCR, como segue: Fase 1, PCR-G1/G2 para confirmação do estatuto de isolado patogénico; Fase 2, PCR-iRep1, de modo a diferenciar os isolados murinos ao nível do sorogrupo. O procedimento efectuado foi semelhante ao descrito nos pontos 3.2.1.4.1. e 3.2.1.4.2., envolvendo a obtenção de DNA e a respectiva amplificação.

À semelhança do estudo desenvolvido com os isolados humanos, uma amostra representativa de estirpes isoladas (N=21; 8,2%), tendo em conta a espécie de roedor e o biótopo, foi igualmente submetida à identificação da espécie genómica por sequenciação (ponto 3.2.1.4.3.). No total, foram analisados 11 isolados provenientes de roedores da espécie *Mus musculus* (52,4%), 8 (38,1%) de *Rattus rattus* e 2 (9,5%) de *Rattus norvegicus*. Estes animais foram capturados em aterros ou ambientes peri-urbanos (n=9), em áreas de floresta (n=4) e em pastagens (n=8).

3.2.3. Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira*, pela técnica de referência, em soros de doentes e de reservatórios silváticos (murinos)

A técnica de aglutinação microscópica (TAM) foi utilizada para analisar a presença de aglutininas anti-*Leptospira* em soros (N=26) dos doentes com cultura positiva e em soros (N=535) de murinos capturados em São Miguel, como já referido nos pontos 3.1.2. e 3.1.4., respectivamente.

3.2.3.1. Preparação dos antígenos de referência

Os antígenos a utilizar na técnica de aglutinação microscópica (estirpes de referência e isolados nacionais; *cft.* **Tabela 2**, pág. 37) foram preparados por sementeira directa em meio de EMJH líquido, quatro a oito dias antes da realização do teste; este procedimento foi sempre desenvolvido “à chama” e dentro de uma câmara de fluxo laminar previamente esterilizada. Uma vez atingida a densidade ideal (10^8 bactérias/ml), confirmou-se (por exame microscópico directo) a qualidade das culturas em termos da mobilidade das leptospiros, e ausência de contaminantes e de auto-aglutinações indutoras de falsos positivos¹⁰¹. As estirpes foram mantidas à temperatura ambiente, sem agitação e protegidas da luz, pelo menos, duas horas antes da realização da técnica.

3.2.3.2. Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM)

Numa primeira fase “de rastreio”, as amostras de soro (humanas e animais) foram diluídas a 1:20 e a 1:10 e analisadas a 1:40/1:80 e 1:20/1:40, respectivamente, de modo a identificar os doentes e animais sororeactivos com títulos anti-*Leptospira* duvidosos (humanos a 1:40 e animais a 1:20) e/ou positivos ($>1:80$ nos humanos e $\geq 1:40$, nos animais)

(*cft. Anexo IV*). Os soros que apresentaram uma percentagem de leptospiras aglutinadas maior ou igual a 50% na diluição de 1:80 (nos humanos) e 1:40 (nos animais) foram posteriormente analisados em diluições seriadas ao dobro (até 1:5120 ou 1:10240), com cada um dos antigénios reactivos na fase inicial. As diluições dos soros foram efectuadas directamente na microplaca e a adição de igual volume do antigénio ao soro diluído, em cada poço, correspondeu à diluição final pretendida; a leitura das placas foi efectuada directamente num microscópio de fundo escuro adaptado para o efeito com uma objectiva de longa distância focal (ampliação final 20x) (*cft. Anexo IV*).

3.2.3.3. Critérios de leitura e interpretação do teste de referência

Por deliberação do Subcomité Taxonómico da *Leptospira* (1984) *cit.* pela WH0/ILS¹⁰¹, o **título final** da técnica de aglutinação microscópica (TAM) corresponde à diluição sérica na qual estão presentes até 50% de bactérias livres, quando comparada com a cultura de controlo diluída 1:2 em tampão fosfato salino (*cft. Anexo II e IV*). Em caso de **co-aglutinação**, considera-se como sorogrupo presuntivo da estirpe infectante o que apresenta um título superior em, pelo menos, duas diluições, sendo as restantes aglutinações consideradas reacções cruzadas⁹⁸. Na ausência deste pressuposto, ou seja, face à ocorrência de co-aglutininas com título idêntico ou semelhante, considerou-se a co-aglutinação como sendo de **sorogrupo indeterminado (SI)**. Em regra, um título igual ou superior a 1:100, em área não endémica, é sinónimo de uma reactividade com significado laboratorial, na leptospirose humana¹⁰¹. No entanto, o limiar de positividade adoptado pela Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme (IHMT/UNL), na sua prestação de serviços à comunidade, é de 1:160, face à conhecida situação ‘epidemiológica’ da população Portuguesa, a nível nacional, e em particular da população Açoriana, residente em área endémica. No que se refere aos animais,

domésticos e silváticos, o limiar de positividade pode ser inferior, dada a ocorrência de infecções por *Leptospira* com títulos muito baixos (1:10) ou mesmo inexistentes, em animais com confirmação bacteriológica da presença do agente infectante; tal é o caso das infecções por Hardjo em bovinos^{35,21}. No que se refere aos roedores, o limiar de positividade é, em regra, de 1:40, embora a presença de títulos baixos (1:20/1:30), em animais com exame bacteriológico positivo, confirme o contacto do animal com leptospiros, num passado mais ou menos recente^{93,94,27}.

3.2.4. Tratamento de dados

Os títulos geométricos médios (TGM) obtidos pela técnica de aglutinação microscópica (TAM), por espécie de roedor e sorogrupo, foram calculados de acordo com Sokal *et al.*⁸⁵. A estimativa da concordância entre os resultados obtidos pelo PCR-iRep1 e pela TAM na identificação do sorogrupo infectante foi efectuada pelo cálculo da estatística Kappa (K)⁵⁰.

A análise dos resultados da sequenciação foi desenvolvida em Amsterdão, na sequência do envolvimento da equipa Holandesa no Projecto de Investigação da Leptospirose nos Açores. A análise dos clusters para geração do dendrograma foi feita através do software Vector NTI 10 (Invitrogene[®]) e a análise filogenética desenvolvida com base no programa computacional MEGA4⁸⁹. A árvore filogenética foi construída pelo Método de *Neighbour-Joining*, utilizando o Modelo Jukes-Cantor⁸⁹.

4. Resultados

4.1. Identificação dos isolados humanos de *Leptospira* spp

Os dez isolados humanos de *Leptospira* spp submetidos aos vários testes de identificação no âmbito deste estudo foram obtidos pela seguinte ordem: três em 2006 (AzHuL01 a AzHuL03), seis em 2007 (AzHuL04 a AzHuL09) e um em 2008 (AzHuL10). A idade dos doentes com cultura positiva, todos do sexo masculino, variou de 19 a 56 anos (média 32 anos, DP \pm 11). Seis dos dez pacientes tinham uma ocupação (jardineiro, pedreiro ou agricultor) que envolvia o contacto directo com fontes potenciais de infecção. As manifestações clínicas aquando da admissão hospitalar (média de 5 dias após o início dos sintomas; DP \pm 2) incluíram febre, arrepios, cefaleias e mialgias. A icterícia esteve apenas presente num caso com falência renal aguda (AzHuL05) e um quadro de pneumonia foi atribuído a um doente com Leptospirose anictérica (AzHuL02). As culturas positivaram em média 33 dias (15-76, DP \pm 19), após o início dos sintomas.

4.1.1. Análise antigénica

Os dez isolados humanos demonstraram a morfologia típica e a motilidade característica do género *Leptospira* quando observados em microscopia de fundo escuro. A ausência de crescimento à temperatura de 13°C e na presença de 8-azaguanina, a par das alterações morfológicas (forma arredondada) em meio de EMJH com NaCl (1M), sugeriram o carácter patogénico de todos os isolados e a respectiva classificação como espiroquetas do complexo *L. interrogans* sensu lato.

4.1.1.1. Anti-soros de referência hiperimunes e anticorpos monoclonais

A identificação dos isolados humanos, utilizando um painel de anti-soros de referência hiperimunes, específicos dos sorogrupos dominantes em doentes Açorianos com Leptospirose, permitiu agrupar os isolados em dois sorogrupos patogénicos distintos: Icterohaemorrhagiae (70%) e Ballum (30%) (**Tabelas 6 e 7**).

Tabela 6. Identificação dos isolados humanos (AzHuL01-AzHuL5) de *Leptospira* spp ao nível do sorogrupo, de acordo com os títulos de aglutinação dos respectivos anti-soros de referência hiperimunes.

Anti-soros de referência hiperimunes	Isolados Humanos de <i>Leptospira</i> spp				
	AzHuL01	AzHuL02	AzHuL03	AzHuL04	AzHuL05
Ictero/RGA/1981-Paris (F)	8000-16000	8000	8000	< 500	8000-16000
Ictero/RGA/1984-Hereford (UK)	4000-8000	8000	8000	250-500	8000
Ictero/RGA/1999-Amesterdão (H)	8000-16000	8000	< 8000	500	8000-16000
Ictero/M20/1997-Lisboa (P)	1000-2000	8000-16000	4000-8000	250	16000
Bal/Mus 127/1982-Paris (F)	< 250	< 250	< 250	4000-8000	< 250
Bal/Mus 127/1984-Hereford (UK)	< 250	< 250	< 250	4000	< 250
Resultado final	Ictero 1:8000	Ictero 1:8000	Ictero 1:8000	Bal 1:4000	Ictero 1:16000

Ictero=Icterohaemorrhagiae; Bal=Ballum

Tabela 7. Identificação dos isolados humanos (AzHuL06-AzHuL10) de *Leptospira* spp ao nível do sorogrupo, de acordo com os títulos de aglutinação dos respectivos anti-soros de referência hiperimunes.

Anti-soros de referência hiperimunes	Isolados Humanos de <i>Leptospira</i> spp				
	AzHuL06	AzHuL07	AzHuL08	AzHuL09	AzHuL10
Ictero/RGA/1981-Paris (F)	< 250	8000	16000	< 250	4000 - 8000
Ictero/RGA/1984-Hereford (UK)	< 250	8000	16000	< 250	8000
Ictero/RGA/1999-Amesterdão (H)	< 250	4000 - 8000	16000	< 250	8000
Ictero/M20/1997-Lisboa (P)	< 250	16000	2000	< 250	8000
Bal/Mus 127/1982-Paris (F)	4000	< 250	< 250	2000 - 4000	< 250
Bal/Mus 127/1984-Hereford (UK)	4000	< 250	< 250	4000	< 250
Resultado final	Bal 1:4000	Ictero 1:8000	Ictero 1:16000	Bal 1:4000	Ictero 1:8000

Ictero=Icterohaemorrhagiae; Bal=Ballum

No que se refere à identificação dos isolados ao nível do sorovar, a observação dos perfis de aglutinação com os anticorpos monoclonais específicos dos sorogrupos reactivos evidenciou uma resposta consistente com os sorovares Copenhageni (sorogrupo Icterohaemorrhagiae; isolados AzHuL01, AzHuL02, AzHuL03, AzHuL05, AzHuL07, AzHuL08 e AzHuL10) e Arborea (sorogrupo Ballum; isolados AzHuL04, AzHuL06 e AzHuL09). A título de exemplo, apresentam-se de uma forma esquemática e gráfica os resultados obtidos com dois dos isolados do sorovar Copenhageni (**Tabela 8 e Gráfico 1**) e com os isolados Arborea (**Tabela 9 e Gráfico 2**), por comparação com as respectivas estirpes de referência.

Tabela 8. Títulos de aglutinação (recíprocos) dos anticorpos monoclonais (mAbs) do sorogrupo Icterohaemorrhagiae com estirpes de referência dos sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, e os isolados humanos AzHuL01 e AzHuL02.

Icterohaemorrhagiae		Estirpe de referência/Sorovar		Isolados Humanos	
mAb	Código	Isolado Alemão*/ Copenhageni	RGA / Icterohaemorrhagiae	AzHuL01	AzHuL02
1	F12C3-11	20480	10240	20480	10240
2	F20C3-1	10240	10240	5120	5120
3	F20C4-1	20480	20480	20480	20480
4	F52C1-4	80	1280	80	80
5	F52C2-2	10	1280	10	10
6	F70C4-5	1280	2560	320	320
7	F70C7-11	160	20480	320	80
8	F70C13-5	640	160	640	1280
9	F70C14-10	10	20480	10	10
10	F70C20-3	5120	10240	5120	5120
11	F70C24-20	2560	160	1280	1280
12	F70C26-3	1280	160	1280	640
13	F82C1-3	10	10	10	10
14	F82C2-3	10	10	10	10
15	F82C7-3	10	10	10	10
16	F82C8-4	10	10	10	10
17	F89C3-3	10	10	10	10
18	F89C12-4	640	10	160	320

*Isolado Alemão (humano) identificado pelo *Royal Tropical Institute* e confirmado por CAAT (*Cross-Agglutinin-Absorption-Test*) como pertencente ao sorovar Copenhageni.

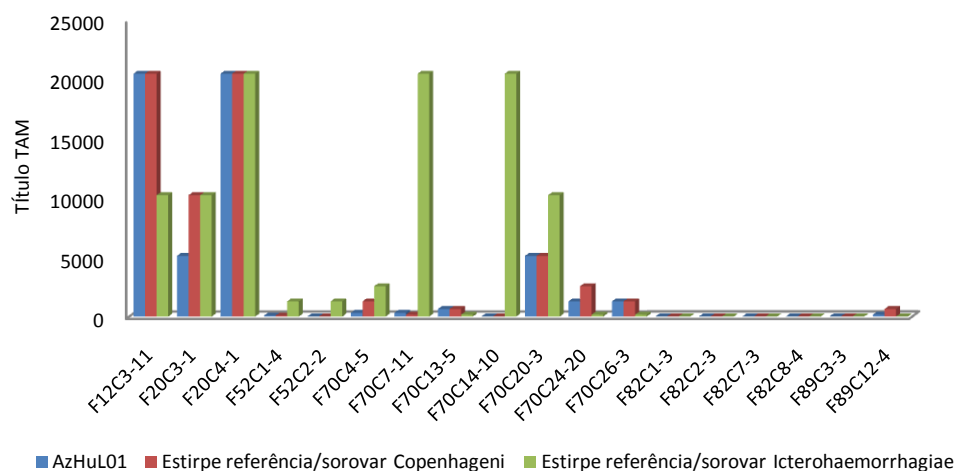


Gráfico 1. Títulos de aglutinação (recíprocos) dos anticorpos monoclonais (mAbs) do sorogrupo Icterohaemorrhagiae com o isolado humano AzHuL01 e estirpes de referência dos sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae.

Tabela 9. Títulos de aglutinação (recíprocos) dos anticorpos monoclonais (mAbs) do sorogrupo Ballum com estirpes de referência dos sorovares Arborea e Ballum, e com os isolados humanos AzHuL04, AzHuL06 e AzHuL09.

Ballum		Estirpe de referência/Sorovar		Isolados Humanos		
mAb	Código	Arborea /Arborea	Mus 127/ Ballum	AzHuL04	AzHuL06	AzHuL09
1	F74C1	1280	640	640	640	2560
2	F74C4	10	5120	10	10	10
3	F74C7	320	640	640	640	1280

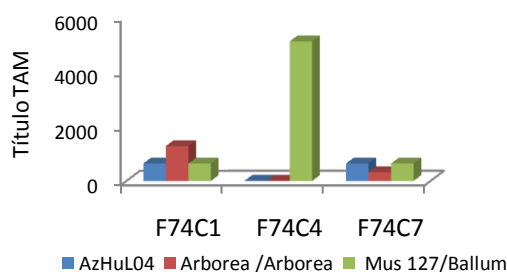


Gráfico 2. Títulos de aglutinação (recíprocos) dos anticorpos monoclonais (mAbs) do sorogrupo Ballum com o isolado humano AzHuL04 e estirpes de referência dos sorovares Arborea e Ballum.

4.1.2. Análise molecular

4.1.2.1. PCR-G1/G2

Na análise do DNA dos dez isolados humanos por PCR, utilizando os *primers* G1 e G2, foi possível a obtenção de um fragmento específico de 285 pb na totalidade das estirpes analisadas (**Figura 8**).

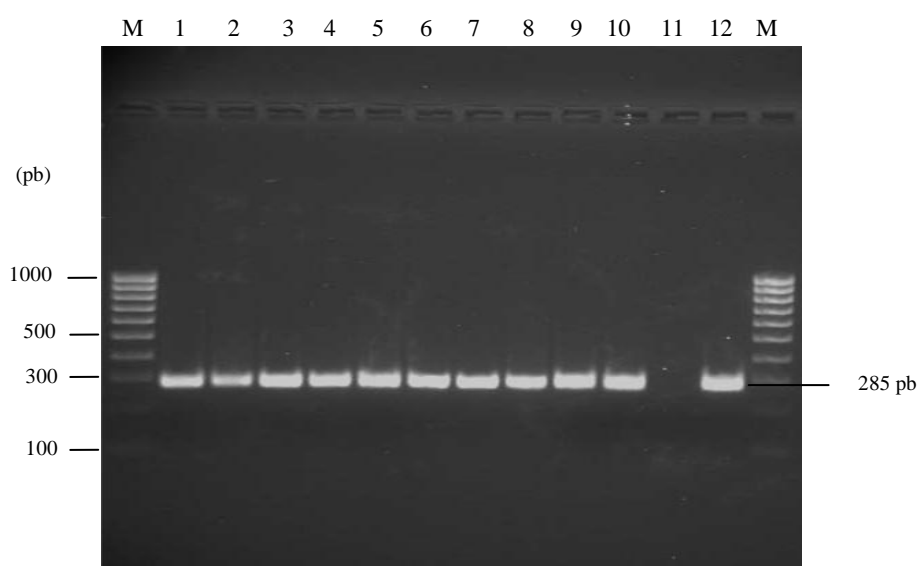


Figura 8. PCR-G1/G2 – resultados obtidos na análise dos isolados humanos de *Leptospira* spp. M-marcador 100-1000 pb; 1-AzHuL01; 2-AzHuL02; 3-AzHuL03; 4-AzHuL04; 5-AzHuL05; 6-AzHuL06; 7-AzHuL07; 8-AzHuL08; 9-AzHuL09; 10-AzHuL10; 11-Controlo negativo (2ª nível PCR); 12-Controlo positivo (RGA - sorogrupo Icterohaemorrhagiae).

4.1.2.2. PCR-iRep1

A análise molecular dos isolados humanos pelo PCR-iRep1 (**Figuras 9 e 10**, e dados não apresentados) permitiu discriminar os sorogrupos já identificados pela análise antigénica, ou seja, os sete isolados Icterohaemorrhagiae e os três isolados Ballum apresentaram um padrão molecular análogo ao das respectivas estirpes de referência (RGA/M20 e Mus 127/Arborea).

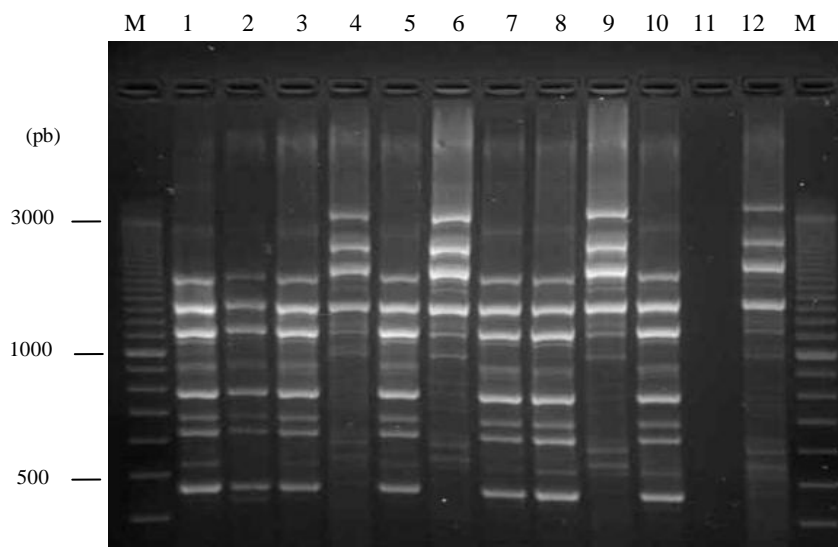


Figura 9. PCR-iRep1 – perfis dos primeiros isolados de *Leptospira* spp provenientes de doentes Açorianos com diagnóstico de Leptospirose. M-Marcador de peso molecular 100-3000 pb; 1-AzHuL01; 2-AzHuL02; 3-AzHuL03, 4-AzHuL04; 5-AzHuL05; 6-AzHuL06; 7-AzHuL07; 8-AzHuL08; 9-AzHuL09; 10-AzHuL10; 11-controlo negativo (2º nível-PCR); 12-sorogrupo Ballum (estirpe Mus 127/sorovar Aborea).

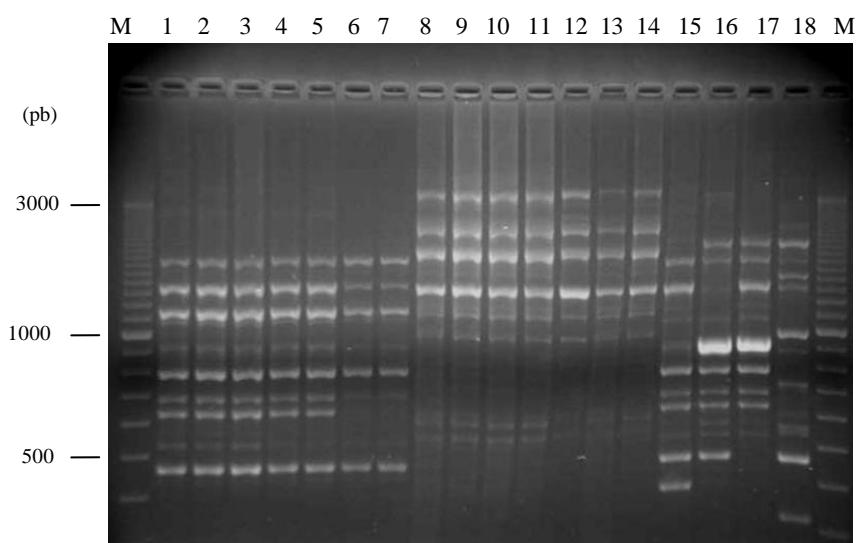


Figura 10. PCR-iRep1 – perfis de isolados humanos e murinos do género *Leptospira* provenientes dos Açores. M-Marcador de peso molecular 100-3000 pb; 1-3 Isolados humanos do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (AzHuL01, AzHuL05, AzHuL08); 4-5: sorogrupo Icterohaemorrhagiae (estirpe RGA/sorovar Icterohaemorrhagiae e estirpe M20/ sorovar Copenhageni); 6-7: Isolados de roedores da ilha Terceira do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (AzTRoPu74, AzTRoH91); 8-10: Isolados humanos do sorogrupo Ballum (AzHuL04, AzHuL06, AzHuL09); 11-12: sorogrupo Ballum (estirpe Mus 127/sorovar Ballum e estirpe Arborea/sorovar Arborea); 13-14: Isolados de roedores de São Miguel do sorogrupo Ballum (AzSMRoS130, AzSMRoS184); 15: sorogrupo Sejroe (estirpe Hardjo-bovis/ /sorovar Hardjo); 16: sorogrupo Canicola (estirpe Hond Utrecht IV/sorovar Canicola); 17: sorogrupo Australis (estirpe Jêz Bratislava/sorovar Bratislava); 18: sorogrupo Pomona (estirpe Mozdok/sorovar Pomona).

De referir igualmente que as estirpes pertencentes ao mesmo sorogrupo (*e.g.*, RGA/M20 do sorogrupo Icterohaemorrhagiae) não foram diferenciadas por esta análise molecular (**Figura 10**). A análise pelo PCR-iRep1 de isolados de roedores capturados nas ilhas Terceira e de São Miguel, e identificados por sequenciação como *L. interrogans* sensu stricto (AzTRoPu74 e AzTRoH91) e *L. borgpetersenii* (AzSMRoS130 e AzSMRoS184) (*cft.* **Tabela 2**, pág. 37), revelou a ocorrência de padrões de DNA análogos aos das estirpes isoladas de doentes provenientes de São Miguel (**Figura 10**) e de outros roedores de ambas as ilhas (*cft.* ponto 4.2.2. - **Figuras 13 a 15** e dados não apresentados).

4.1.2.3. Sequenciação

A sequenciação e estudos filogenéticos posteriores baseados nas sequências de restrição G1-G2 do gene *secY* permitiram a identificação de sete isolados humanos como pertencentes às espécies *L. interrogans* sensu stricto e os restantes a *L. borgpetersenii* (**Figura 11**). Aos isolados humanos e murinos foram atribuídos os seguintes números de acesso no Gene Bank: **FJ911689-FJ911698** e **GQ144958-GQ144961**, respectivamente.

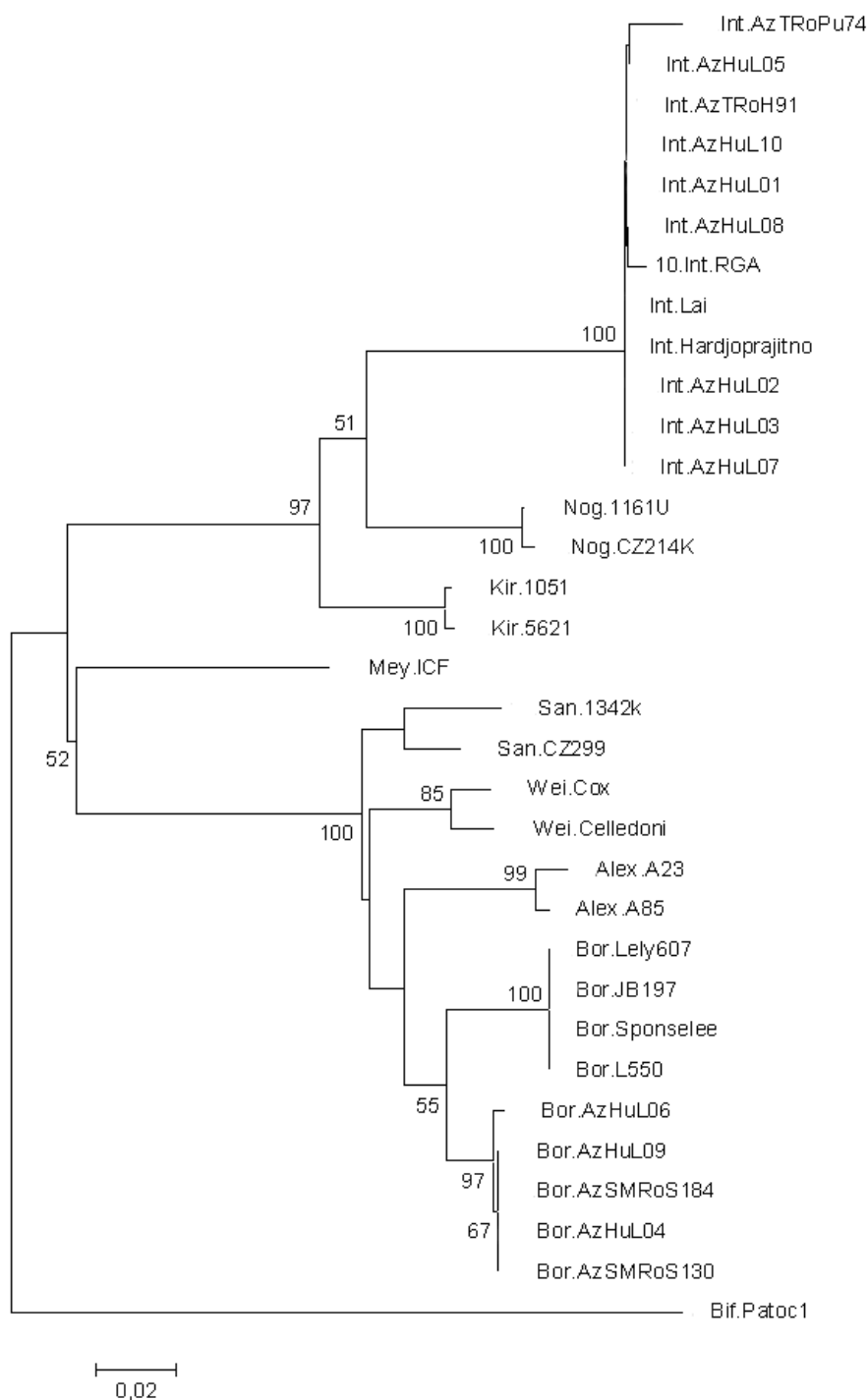


Figura 11. Árvore filogenética baseada nas distâncias Tamura-Nei e elaborada, utilizando o Método de *Neighbour-Joining*. As distâncias foram calculadas a partir das sequências de restrição G1-G2 e baseiam-se em 32 estirpes de *Leptospira*. Legenda: *L. interrogans* (Int.), isolados de roedores – AzTRoPu74, AzTRoH91, e humanos – AzHuL01-03, AzHuL05, AzHuL07-08, AzHuL10; *L. borgpetersenii* (Bor.), isolados de roedores – AzSMRoS184, AzSMRoS130, e humanos – AzHuL04, AzHuL06, AzHuL09; e estirpes de referência (as restantes sequências). Os números representam a percentagem de *bootstrapping* (1000 replicados). Apenas valores *bootstrap* acima dos 50% são mostrados. A estirpe saprófita Patoc 1, utilizada como referência, não pertence ao complexo *Leptospira interrogans* sensu lato.

Os resultados obtidos pelas diferentes abordagens (antigénica e molecular) na caracterização dos isolados humanos de *Leptospira* spp encontram-se resumidos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Resumo dos resultados obtidos na caracterização antigénica e molecular dos dez isolados humanos de *Leptospira*.

Isolados humanos de <i>Leptospira</i> /ano	Anti-soros de referência (sorogruppo/título)	Anticorpos Monoclonais (sorovar)	PCR -iRep1 (sorogruppo)	Sequenciação espécie genómica [Nº acesso Gene Bank]
AzHuL01/2006	Icterohaemorrhagiae 1/8000	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> [FJ911689]
AzHuL02/2006	Icterohaemorrhagiae 1/8000	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> [FJ911690]
AzHuL03/2006	Icterohaemorrhagiae 1/8000	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> [FJ911691]
AzHuL04/2007	Ballum 1/4000	Arborea	Ballum	<i>L. borgpetersenii</i> i[FJ911692]
AzHuL05/2007	Icterohaemorrhagiae 1/16000	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> [FJ911693]
AzHuL06/2007	Ballum 1/4000	Arborea	Ballum	<i>L. borgpetersenii</i> [FJ911694]
AzHuL07/2007	Icterohaemorrhagiae 1/8000	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> [FJ911695]
AzHuL08/2007	Icterohaemorrhagiae 1/16000	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> [FJ911696]
AzHuL09/2007	Ballum 1/4000	Arborea	Ballum	<i>L. borgpetersenii</i> [FJ911697]
AzHuL10/2008	Icterohaemorrhagiae 1/8000	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> [FJ911698]

4.2. Identificação molecular dos isolados murinos

4.2.1. PCR-G1/G2

A amplificação do DNA dos 257 isolados murinos com os *primers* G1 e G2 permitiu a obtenção de um fragmento específico de 285 pb na totalidade das estirpes analisadas (**Figura 12** e dados não apresentados).

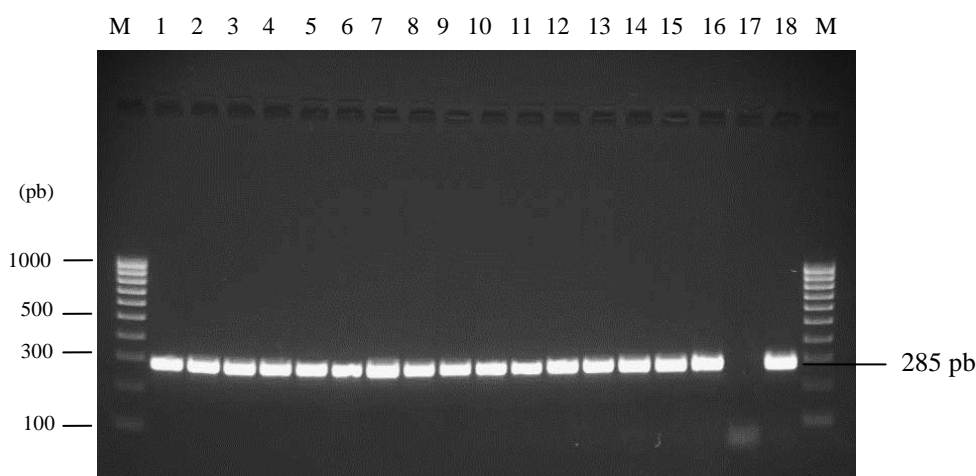


Figura 12. PCR-G1/G2 - resultados obtidos na análise de isolados de *Leptospira* de roedores murinos capturados na ilha de São Miguel, no âmbito dos Estudos Horizontal (H) e Vertical (V), do Projecto de Investigação da Leptospirose nos Açores. M-marcador 100-1000 pb; 1-H318; 2-H306; 3-H408; 4-H467; 5-H471; 6-H458; 7-H474; 8-H515; 9-V125, 10-V200; 11-V221; 12-V288; 13-V213; 14-V251; 15-V108; 16-V137; 17-Controlo negativo (2º nível-PCR); 18- Controlo positivo (RGA-Icterohaemorrhagiae).

4.2.2. PCR-iRep1

A leitura dos perfis obtidos pelo PCR-iRep1, resultantes da amplificação do DNA de 257 isolados de *Leptospira* provenientes de roedores murinos capturados na ilha de São Miguel, foi efectuada à semelhança dos isolados humanos, por comparação com os padrões de amplificação obtidos na análise de estirpes de referência (**Figuras 13 a 16** e dados não apresentados). Os 257 isolados de *Leptospira* analisados apresentaram padrões de amplificação semelhantes aos obtidos com as estirpes de referência dos sorogrupos

Icterohaemorrhagiae e Ballum (**Figuras 13 a 16**). A referida técnica permitiu a obtenção de perfis distintos em estirpes pertencentes a diferentes sorogrupos, mas não diferenciou estirpes do mesmo sorogrupo pertencentes a diferentes sorovares (**Figuras 13 a 16**).

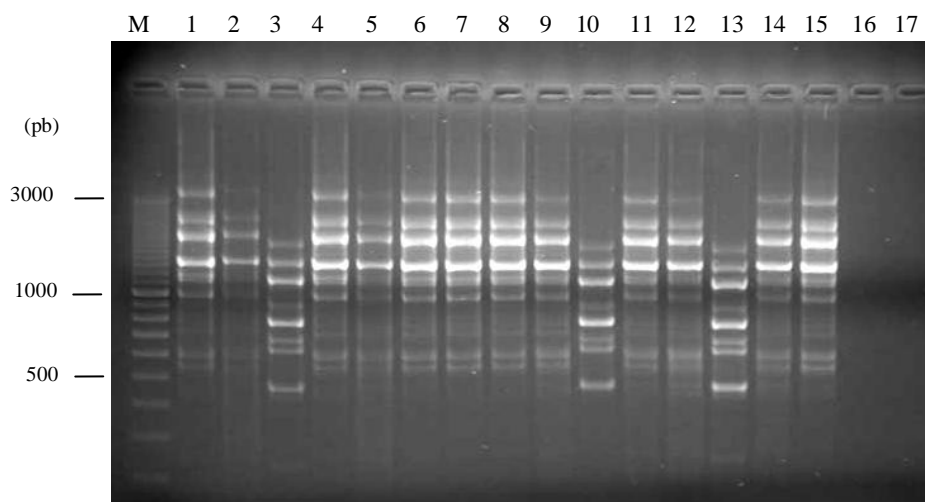


Figura 13. PCR-iRep1 – perfis de isolados de *Leptospira* obtidos de roedores murinos capturados em São Miguel (H=Estudo Horizontal) e de estirpes de referência. M-Marcador 100-3000 pb; 1-H164; 2-H112; 3-H1; 4-H521; 5-H514; 6-H417; 7-H383; 8-H331; 9-H442; 10-H512; 11-H113; 12-H406; 13-estirpe M20/sorovar Copenhageni/sorogrupo Icterohaemorrhagiae; 14-estirpe Mus127/sorovar Ballum/sorogrupo Ballum; 15-estirpe Arborea/sorovar Arborea/sorogrupo Ballum; 16-controlo negativo (1º nível-extração de DNA); 17-controlo negativo (2º nível-PCR).

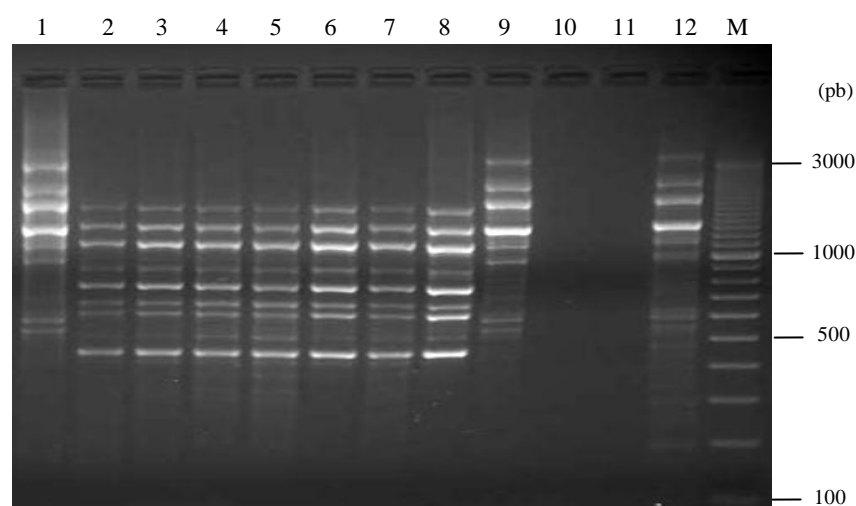


Figura 14. PCR-iRep1 – perfis de isolados obtidos de roedores murinos capturados em São Miguel (H=Estudo Horizontal). 1-H145; 2-H370; 3-H505; 4-H439; 5-H211; 6-H446; 7-H430; 8-H387; 9-H320; 10-controlo negativo (1º nível-extração de DNA); 11-Controlo negativo (2º nível-PCR); 12-estirpe Mus127/sorovar Ballum/sorogrupo Ballum; M-Marcador 100-3000 pb.

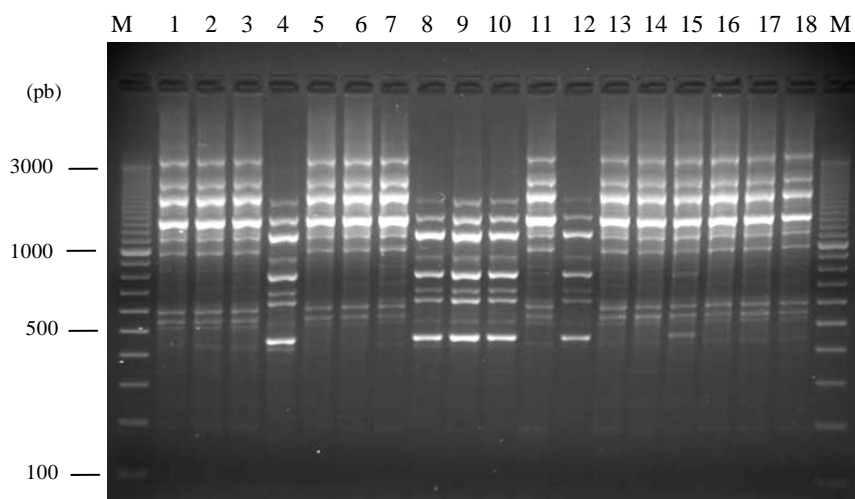


Figura 15. PCR-iRep1 – perfis de isolados de *Leptospira* obtidos de roedores capturados em São Miguel (V=Estudo Vertical). M-Marcador 100-3000 pb; 1-V82; 2-V93; 3-V67; 4-estirpe de referência M20/sorovar Copenhageni/sorogrupo Icterohaemorrhagiae; 5-V174; 6-V33; 7-V56; 8-V163; 9-V65; 10-V91; 11-estirpe de referência Mus127/sorovar Ballum/sorogrupo Ballum; 12-V54; 13-V164; 14-V13; 15-V167; 16-V9; 17-V28; 18-V76.

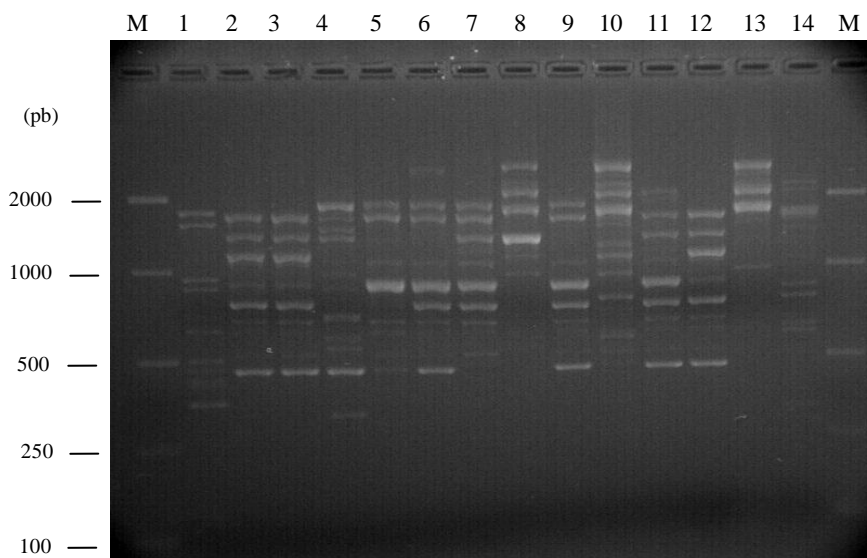


Figura 16. Perfis PCR-iRep1 de estirpes de *Leptospira* pertencentes à Leptospiroteca da ULBL/IHMT. M-marcador 100-2000 pb; 1-Patoc 1 (sorogrupo Semaranga); 2-RGA (sorogrupo Icterohaemorrhagiae); 3-M20 (sorogrupo Icterohaemorrhagiae); 4-Mozdock (sorogrupo Pomona); 5-Valbuzii (sorogrupo Grippotyphosa); 6-Hond Utrecht IV (sorogrupo Canicola); 7-Bratislava (sorogrupo Australis); 8-Arborea (sorogrupo Ballum); 9-Ballico (sorogrupo Australis); 10-Louisiana (sorogrupo Louisiana); 11-Swart (sorogrupo Bataviae); 12-M20 (isolado de ouriço-cacheiro, São Miguel)/sorogrupo Icterohaemorrhagiae; 13-M84 (sorogrupo Sejroe); 14-Celledoni (sorogrupo Celledoni).

No total, o PCR-iRep1 permitiu a diferenciação de 181 (70,4%) isolados como pertencentes ao sorogrupo Ballum e de 76 (29,6%) isolados com perfis análogos ao do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (Gráfico 3 e Tabela 11).

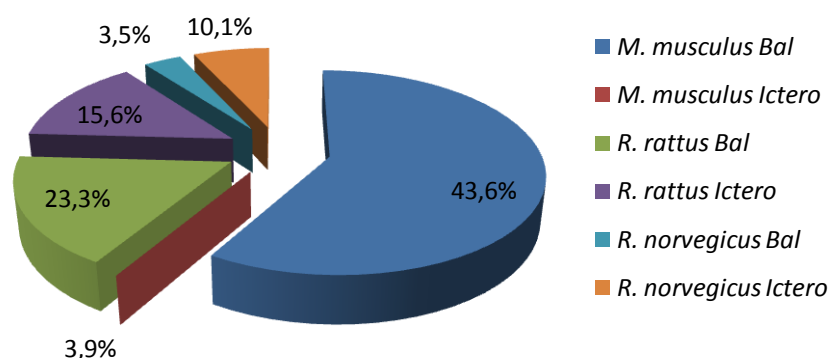


Gráfico 3. Representação esquemática dos sorogrupos de *Leptospira interrogans* s.l. versus espécie de roedor com cultura positiva, após análise, pelo PCR-iRep1, de 257 isolados de *Leptospira* obtidos de roedores capturados na ilha de São Miguel, no âmbito do Projecto de Investigação da Leptospirose nos Açores (Bal=Ballum; Ictero=Icterohaemorrhagiae).

Tabela 11. Distribuição dos isolados murinos de *Leptospira interrogans* s.l., de acordo com o sorogrupo (resultado do PCR-iRep1) e o habitat/espécie de roedor capturado na ilha de São Miguel (2004-2006)*.

Espécie de roedor / sorogrupo de <i>L. interrogans</i> sensu lato							
Biótopo	<i>Mus musculus</i>		<i>Rattus rattus</i>		<i>Rattus norvegicus</i>		Total
	n=122		n=100		n=35		
	Bal	Ictero	Bal	Ictero	Bal	Ictero	
Peri-urbano	17	0	5	4	1	2	29
Pastagem	46	5	23	20	3	14	111
Aterro	17	0	6	0	4	10	37
Mata	32	5	25	16	1	0	79
Total	112	10	60	40	9	26	257
(%)	(91,8)	(8,2)	(60,0)	(40,0)	(25,7)	(74,3)	(100,0)

* Investigação desenvolvida no âmbito do Projecto de Investigação da Leptospirose nos Açores (2004-2008)
Bal=Ballum; Ictero=Icterohaemorrhagiae

A espécie de roedor que apresentou maior taxa de infecção por estirpes do sorogrupo Ballum (Tabela 11) foi *Mus musculus* (61,9%; 112/181), seguida de *Rattus rattus* (33,1%;

60/181) e de *R. norvegicus* (5,0%; 9/181). O sorogrupo Icterohaemorrhagiae foi particularmente identificado em roedores do género *Rattus* (86,8%; 66/76) com a seguinte distribuição por espécie: *R. rattus* - 52,6% (n=40) e *R. norvegicus* - 34,2% (n=26) (**Tabela 11**). Relativamente aos resultados obtidos por biótopo e espécie de roedor, o maior número de capturas verificou-se no biótopo da pastagem (43,2%; 111/257), sendo *Mus musculus* a espécie predominante (51/111), com uma taxa de infecção de 90,2% (46/51) por estirpes do sorogrupo Ballum (**Tabela 11 e Gráfico 4**).

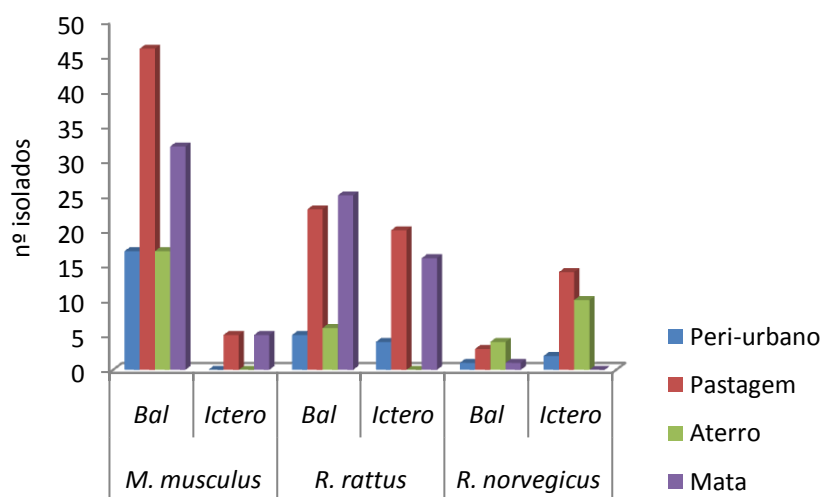


Gráfico 4. Distribuição, por espécie de roedor e biótopo, dos sorogrupos de *Leptospira* identificados pelo PCR-iRep1 em 257 isolados obtidos de roedores murinos capturados em São Miguel, no âmbito do Projecto de Investigação da Leptospirose nos Açores (2004-2008). Bal=Ballum; Ictero=Icterohaemorrhagiae.

4.2.3. Sequenciação

Ao seleccionar-se uma amostra representativa de isolados provenientes de roedores de diferentes espécies e biótopos (ponto 3.2.2.4.), os 21 (8,2%) isolados murinos analisados por

sequenciação foram identificados na sua totalidade como pertencentes à espécie genómica *L. borgpetersenii*.

4.3. Resultados da pesquisa sorológica

4.3.1. Doentes com cultura positiva

Cinco (50%) dos doentes com hemocultura positiva apresentaram sorologia positiva ($\geq 1:160$) na primeira amostra sérica analisada pela TAM, enquanto três evidenciaram um título não conclusivo e dois foram negativos aquando da admissão hospitalar (**Tabela 12**).

Tabela 12. Resultados da sorologia (TAM) em amostras séricas (seriadas) dos 10 doentes com hemocultura positiva para *Leptospira*.

Nº isolado	1ª amostra (nº dias)	2ª amostra (nº dias)	3ª amostra (nº dias)
AzHuL01	SI $\leq 1:2560$ (15)	Ictero 1:5120 (32)	Ictero 1:10240 (46)
AzHuL02	SI 1:5120 (21)	Ictero 1:2560 (37)	
AzHuL03	NC (6)	Ictero 1:1280 (22)	Ictero 1:640 (60)
AzHuL04	Neg (3)	NC (17)	Bal 1:1280 (74)
AzHuL05	Neg (5)	Ictero 1:2560 (16)	
AzHuL06	SI 1:320 (6)	Bal 1:1280 (28)	Bal 1:320 (50)
AzHuL07	Ictero 1:1280 (9)	Ictero 1:2560 (25)	
AzHuL08	NC (3)	Ictero 1:1280 (9)	Ictero 1:1280 (61)
AzHuL09	Bal 1:320 (8)	Bal 1:2560 (28)	
AzHuL10	NC (8)	Ictero 1:2560 (22)	Ictero 1:1280 (62)

Ictero=Icterohaemorrhagiae; Bal=Ballum; NC: não conclusivo/duvidoso (1:40 ou 1:80); Pos: positivo ($\geq 1:160$); Neg: Negativo ($<1:40$); SI=Sorogruppo indeterminado (co-aglutinação)

A pesquisa de anticorpos específicos pela técnica de referência permitiu a detecção de títulos significativos anti-Icterohaemorrhagiae e anti-Ballum (**Tabela 12**), com os seguintes títulos geométricos médios globais: $TGM_{Ictero}=2276$ e $TGM_{Bal}=1000$ (**Tabelas 13 e 14**, respectivamente).

Tabela 13. Cálculo do Título Geométrico Médio (TGM) para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae, em sete doentes com Leptospirose e hemocultura positiva.

Títulos (T)	Nº doentes	logT	log *n	TGM= $\text{anti} \sum \log^*n/N$
640	1	2,8	2,8	2275,84
1280	1	3,1	3,1	
2560	4	3,4	13,6	
10240	1	4,0	4,0	
Total	7 (N)	13,3	23,5	

Tabela 14. Cálculo do Título Geométrico Médio (TGM) para o sorogrupo Ballum, em três doentes com Leptospirose e hemocultura positiva.

Títulos (T)	Nº doentes	logT	log *n	TGM= $\text{anti} \sum \log^*n/N$
320	1	2,5	2,5	1000
1280	1	3,1	3,1	
2560	1	3,4	3,4	
Total	3 (N)	9	9	

4.3.2. Roedores

- Roedores com cultura de rim positiva, em que foi efectuada a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* e a diferenciação molecular do respectivo isolado por PCR-iRep1 (n=128)

De acordo com a **Tabela 15**, foi possível a detecção de anticorpos ($\geq 1:20$) anti-*Leptospira* em 118 (92,2%) dos 128 roedores com cultura de rim positiva, cujos isolados foram identificados ao nível do sorogrupo pelo PCR-iRep1; destes, 106 (89,8%) animais apresentaram títulos positivos ($\geq 1:40$). Os sorogrupos presuntivos identificados pela TAM, com um resultado concordante com o da hemocultura positiva, foram os seguintes: Icterohaemorrhagiae (34 em 46; 73,9%) e Ballum (26 em 60; 43,3%). A percentagem de sorologias de sorogrupo indeterminado (co-aglutinação), com títulos superiores ou iguais a 1:20, foi de 30,5% (36 em 118).

Tabela 15. Resultados da sorologia (TAM) e da análise molecular (PCR-iRep1) do sorogrupo infectante em 128 roedores com cultura de rim positiva.

Roedor	Sorogrupo (PCR- iRep1)	Resultados da sorologia (Técnica de Aglutinação Microscópica)									
		Positivo (≥1:40)				Duvidoso (1:20)				Negativo (ausência de Acs)	Total
		Bal	Ictero	SI	(n)	Bal	Ictero	SI	(n)		
<i>Rattus rattus</i> (N=96)	Bal	24	7	19	(50)	2		2	(4)	3	57
	Ictero	4	21	7	(32)		3		(3)	4	39
<i>Rattus norvegicus</i> (N=30)	Bal	1	3	4	(8)	1	1	2	(4)	1	13
	Ictero		13	1	(14)		1		(1)	2	17
<i>Mus musculus</i> (N=2)	Bal	1		1	(2)						2
	Ictero										
Total		30	44	32	(106)	3	5	4	(12)	10	128

Bal=Ballum; Ictero=Icterohaemorrhagiae; SI=sorogrupo indeterminado (co-aglutinação); Acs=anticorpos

Ainda segundo a Tabela 15, em 7 (7,3%) *R. rattus*, apesar de ter sido confirmada a infecção por *Leptospira* e determinada a identidade das estirpes ao nível do sorogrupo (3 isolados Ballum e 4 isolados Icterohaemorrhagiae), não foram detectados anticorpos específicos anti-*Leptospira*. Em 10% (3 em 30) dos soros analisados pertencentes a *R. norvegicus* não foram detectados anticorpos. Em 13 *R. norvegicus* com cultura positiva para o sorogrupo Ballum, confirmou-se a detecção de aglutininas específicas (anti-Ballum) em 2 (15,4%) animais, com títulos iguais a 1:160 e 1:20, respectivamente; nos restantes 17 *R. norvegicus*, com cultura positiva para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae, 13 (76,5%) apresentaram títulos $\geq 1:40$ anti-Icterohaemorrhagiae. Os 2 roedores da espécie *M. musculus*, com isolados do sorogrupo Ballum, apresentaram anticorpos anti-Ballum a 1:2560 e a 1:40, respectivamente. Os valores globais dos títulos geométricos médios (TGM) por espécie de roedor e sorogrupo foram os seguintes: $TGM_{R.rattus/Bal}=266$; $TGM_{R.rattus/Ictero}=324$; $TGM_{R.norvegicus/Ictero}=278$ (cft. **Anexo VIII**).

A avaliação da concordância dos resultados da sorologia com os da análise molecular (considerada neste caso como abordagem de referência) revelou um valor de Kappa (K), igual a 0,9785 (**Tabela 16**).

Tabela 16. Estimativa da concordância dos resultados positivos da sorologia (sorogrupo presuntivo) *versus* análise molecular (sorogrupo), através da estatística Kappa (K).

Teste TAM (sorogrupo presuntivo)	Teste PCR-iRep1 (sorogrupo)			
	Icterohaemorrhagiae		Ballum	
	Icterohaemorrhagiae	34 (a)	10 (b)	
	Ballum	4 (c)	26 (d)	

a) Verdadeiros Icterohaemorrhagiae; b) Falsos Icterohaemorrhagiae; c) Falsos Ballum, d) Verdadeiros Ballum

Valor de Kappa (K)= $(a+d-P)/(1-P) = 0,9785$

• **Roedores com cultura de rim positiva e sem identificação molecular do sorogrupo dos respectivos isolados, em que foi efectuada a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* (n=163)**

Em 141 (86,5%) dos 163 animais analisados, detectaram-se aglutininas anti-*Leptospira interrogans* s.l. com títulos iguais ou superiores a 1:20 (**Tabela 17**). A identificação do sorogrupo presuntivo (pela TAM) foi possível em 46 (32,6%) animais com sororeactividade anti-Ballum e em 61 (43,3%) com sororeactividade anti-Icterohaemorrhagiae, com a seguinte distribuição, de acordo com os títulos superiores ou iguais a 1:40: Ballum (41 em 46, 89,1%) e Icterohaemorrhagiae (49 em 61, 80,3%).

Tabela 17. Resultados da sorologia (TAM) em 163 roedores com cultura de rim positiva (*L. interrogans* s.l.), mas sem identificação molecular do sorogrupo dos respectivos isolados.

Roedor	Resultados da sorologia (Técnica de Aglutinação Microscópica)									Total (N)
	Positivo (≥ 1:40)				Duvidoso (1:20)				Negativo (ausência de Acs)	
	Bal	Ictero	SI	(n)	Bal	Ictero	SI	(n)		
<i>Rattus rattus</i>	38	39	25	(102)	5	6	4	(15)	13	130
<i>Rattus norvegicus</i>	1	10	3	(14)		6	2	(8)	9	31
<i>Mus musculus</i>	2			(2)						2
Total	41	49	28	(118)	5	12	6	(23)	22	163

Bal=Ballum; Ictero=Icterohaemorrhagiae; SI=sorogrupo indeterminado (co-aglutinação); Acs=anticorpos

No que se refere à distribuição da sororeactividade específica (sorogrupo presuntivo), de acordo com o roedor analisado (**Tabela 17**), confirmou-se em *R. rattus*, a presença de 38 (29,2%) e 39 (30,0%) animais, respectivamente positivos ($\geq 1:40$) para Ballum e Icterohaemorrhagiae; a espécie *R. norvegicus* apresentou aglutininas específicas, com títulos únicos ($\geq 1:20$) anti-Icterohaemorrhagiae, em 16 (51,6%) dos 31 animais com cultura positiva (*Leptospira interrogans* s.l.). Em, respectivamente 10% e 29% dos *R. rattus* e *R. norvegicus* analisados não foram detectados anticorpos. Os dois roedores da espécie *M. musculus* e um animal da espécie *R. norvegicus* foram soropositivos ($\geq 1:40$) para o sorogrupo Ballum. Os valores globais dos TGM por espécie de roedor e sorogrupo foram os seguintes: $TGM_{R.rattus/Bal}=180$; $TGM_{R.rattus/Ictero}=339$; $TGM_{M.musculus/Bal}=56$; $TGM_{R.norvegicus/Ictero}=589$ (cft. Anexo VIII).

• Roedores com cultura de rim negativa, em que foi efectuada a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* (n=244)

Dos 244 animais analisados com cultura negativa, 144 (59,0%) apresentaram anticorpos anti-*Leptospira interrogans* sensu lato (**Tabela 18**).

Tabela 18. Resultados da sorologia (TAM) em 244 roedores com cultura de rim negativa.

Roedor	Resultados da sorologia (Técnica de Aglutinação Microscópica)									Total (N)
	Positivo (≥ 1:40)				Duvidoso 1:20				Negativo (ausência de Acs)	
	Bal	Ictero	SI	(n)	Bal	Ictero	SI	(n)		
<i>Rattus rattus</i>	22	31	37	(90)	4	18	7	(29)	79	198
<i>Rattus norvegicus</i>	9	4	4	(17)		5		(5)	21	43
<i>Mus musculus</i>	2			(2)	1			(1)		3
Total	33	35	41	(109)	5	23	7	(35)	100	244

Bal=Ballum; Ictero=Icterohaemorrhagiae; SI=sorogruppo indeterminado (coaglutinação); Acs=anticorpos

A espécie *R. rattus* apresentou sorologias positivas ($\geq 1:40$) anti-Ballum e anti-Icterohaemorrhagiae em 24,4% (22/90) e 34,4% (31/90), respectivamente; foram também observados 37 (41,1%) animais com sorogruppo indeterminado, ou seja, com co-aglutinação pelos referidos sorogruppos com títulos análogos. Cerca de 50% (21/43) dos roedores da espécie *R. norvegicus* foram negativos pela TAM e 40,9% (9/22) apresentaram aglutininas anti-Icterohaemorrhagiae com títulos reactivos a 1:40 (4 animais) e a 1:20 (5 animais). No que se refere ao título geométrico médio (TGM) em soros positivos, observou-se um valor de 750 para o sorogruppo Icterohaemorrhagiae e de 158 para o sorogruppo Ballum (*cft.* **Anexo VIII**). Os valores globais dos TGM por espécie de roedor e sorogruppo foram os seguintes: $TGM_{R.rattus/Bal}=109$; $TGM_{R.rattus/Ictero}=152$; $TGM_{M.musculus/Bal}=112$; $TGM_{R.norvegicus/Bal}=159$ e $TGM_{R.norvegicus/Ictero}=750$ (*cft.* **Anexo VIII**).

5. Discussão

O presente estudo teve como principais objectivos a caracterização molecular e antigénica das primeiras estirpes de *Leptospira* isoladas de doentes Açorianos, a par da diferenciação molecular de isolados de *Leptospira* obtidos de roedores capturados na ilha de São Miguel. Deste modo, pretendeu-se estabelecer, pela primeira vez, uma associação directa entre as estirpes que infectam a população Açoriana e as que são transmitidas pelos roedores, através da obtenção “*in vitro*” dos primeiros isolados humanos. Paralelamente, procedeu-se à pesquisa de aglutininas específicas em doentes com exame cultural positivo e em roedores com e sem isolado bacteriano, de modo a verificar o grau de concordância entre os resultados da pesquisa directa do agente (após tentativa de isolamento) e da pesquisa indirecta de anticorpos anti-*Leptospira* (resposta humoral). No caso dos roedores, o estudo sorológico foi alargado a indivíduos sem confirmação directa da ocorrência de infecção ou sem identificação do sorogrupo da estirpe infectante, de forma a averiguar de que modo a presença/ausência de anticorpos poderia ser um indicador do estado de portador renal.

A Leptospirose tem sido considerada um problema de Saúde Pública com importância crescente nos Açores, em particular nas ilhas de São Miguel e Terceira, sendo os roedores apontados como os principais disseminadores das leptospirosas^{26,27,30,98}. Contudo, para o estabelecimento de medidas integradas de controlo e prevenção da doença, as fontes de infecção têm de ser estabelecidas correctamente, com base no conhecimento dos ciclos antroponozoonóticos da infecção e baseadas na evidência das mesmas estirpes infectantes quer em doentes quer nos animais silváticos considerados os principais suspeitos.

O projecto de investigação “Epidemiologia e controlo da Leptospirose nos Açores”, decorrente de uma parceria entre o Governo da Região Autónoma e o Governo dos Estados Unidos da América, ao abrigo de um Acordo de Defesa e Cooperação Bilateral (*Scientific*

Cooperative Agreement No. 58-4001-3-F185), foi estabelecido com o objectivo de contribuir para o conhecimento da doença nas ilhas de São Miguel e Terceira, ao nível do(s): *i*) perfil do indivíduo mais exposto e das áreas de maior risco de transmissão; e *ii*) dos padrões de abundância relativa, estrutura populacional, demografia e taxas de infecção dos roedores, enquanto principais reservatórios silváticos de *Leptospira*. Do referido projecto resultou igualmente a transferência de tecnologia de PCR e a implementação de um protocolo para a realização de hemoculturas, em doentes admitidos no HDESPD, com forte suspeita clínica e epidemiológica de Leptospirose. A tentativa de obtenção “*in vitro*” de isolados clínicos humanos não havia sido ainda implementada na Região Autónoma dos Açores devido, não só, à dificuldade técnica da respectiva execução mas, em especial, ao valor diagnóstico limitado desta abordagem laboratorial (cultura em meio selectivo), face à indispensável instituição precoce de antibioterapia para o bom prognóstico da doença. Deste modo, o conhecimento dos sorovares causais na população Açoriana era apenas presuntivo, baseando-se nos títulos de aglutinação específica mais elevados das estirpes representativas de cada sorogrupo patogénico. Na medida em que a gravidade da Leptospirose está associada, entre outros factores, a determinadas estirpes com capacidade de induzir formas mais ou menos severas da doença, como é o caso dos sorovares do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, bem reconhecidos pela sua patogenicidade e virulência⁵², urgiu contribuir para o esclarecimento mais aprofundado das leptospiras circulantes na ilha. Deste modo, a obtenção dos primeiros isolados constituiu um ganho epidemiológico essencial para a identificação definitiva dos sorovares infectantes e dos quadros clínicos associados, com a identificação concomitante das fontes potenciais de contágio.

No decorrer da presente investigação, desenvolvida no âmbito do projecto acima mencionado, os dez isolados clínicos de doentes da ilha de São Miguel, internados com

suspeita de Leptospirose, foram identificados como pertencentes aos sorovares Copenhageni (do sorogrupo Icterohaemorrhagiae) e Arborea (do sorogrupo Ballum), ou seja, os mesmos sorovares diferenciados na análise de isolados de *Leptospira* obtidos de roedores murinos capturados na mesma ilha. Esta associação directa (inérita), veio finalmente comprovar e reforçar os conhecimentos obtidos anteriormente^{25,26,27,28,29} acerca do papel destes animais enquanto principais fontes de infecção humana. De acordo com a informação epidemiológica recolhida para os doentes com hemocultura positiva, a exposição ocupacional (seis casos) e acidental (quatro casos) favoreceu o contacto directo com animais (especialmente roedores e bovinos), água, solo e/ou vegetação contaminados, como factores de risco potencial na transmissão de leptospiros. O facto de todos serem do sexo masculino está de acordo com a reconhecida maior prevalência da doença em indivíduos deste género, fruto do desenvolvimento de actividades profissionais mais expostas ao contacto com as fontes naturais de infecção^{17,67}.

Os testes fenotípicos realizados, para avaliar o crescimento dos isolados clínicos na presença de 8-azaguanina (225 µg/ml), de NaCl (1M) e a 13°C, permitiram uma caracterização preliminar do respectivo estatuto patogénico e a consequente inclusão taxonómica no complexo *L. interrogans* sensu lato (s.l.). De facto, ao contrário do verificado para a estirpe saprófita Patoc 1, utilizada como controlo nos referidos ensaios, os isolados humanos não cresceram na presença da 8-azaguanina, devido à incorporação do referido composto (análogo das purinas) na composição dos respectivos ácidos nucleicos⁴⁵. A estirpe Patoc 1, enquanto leptospira saprófita, possui a capacidade de sintetizar os dois tipos de bases azotadas e o seu crescimento não é influenciado pela presença de inibidores com estas características³⁷. Por sua vez, o crescimento distinto das estirpes patogénicas, na presença de NaCl (1 M) e à temperatura de 13°C, está respectivamente associado a diferenças no

comportamento da membrana externa, que mantendo a respectiva integridade demora menos tempo a separar-se do cilindro protoplasmático, com a consequente alteração da forma e redução do número de células iniciais, e ao facto destas estirpes estarem adaptadas a viver no interior dos túbulos renais de mamíferos (temperaturas superiores a 30°C), em vez de águas superficiais como as saprófitas^{6,44}. Embora se antecipasse que as estirpes isoladas de doentes com um quadro clínico de Leptospirose pertenceriam ao complexo *L. interrogans* s.l., é de salientar que determinadas espécies genómicas do complexo *L. biflexa* s.l. podem ser responsáveis, ainda que raramente, por infecções humanas, assumindo um comportamento intermédio quando analisadas pelos referidos testes fenotípicos²⁰.

Dadas as dificuldades associadas à classificação das leptospiros, pela coexistência de dois métodos taxonómicos (genético e convencional), recorreu-se a uma abordagem polifásica baseada, quer na sequenciação e diferenciação molecular por PCR-G1/G2 e PCR-iRep1, quer no estudo “clássico” das reactividades antigénicas dos isolados humanos obtidos, para determinação do sorogrupo e do sorovar, utilizando anti-soros de referência hiperimunes e anticorpos monoclonais específicos, respectivamente. Esta última análise revelou, como já referido, dois sorovares distintos, Copenhageni (sete casos) e Arborea (três casos), o que está de acordo com os títulos (significativos) de aglutinação com as estirpes do sorogrupo mais reactivo, obtidos em soros da fase de convalescença dos respectivos doentes ($TGM_{Ictero}=2276$ e $TGM_{Bal}=1000$).

No que respeita à abordagem molecular, a utilização do PCR-G1/G2 confirmou o estatuto patogénico já obtido pelos métodos convencionais. O conhecimento prévio da ausência da espécie *L. kirschneri* em São Miguel^{25,26} permitiu a utilização deste tipo de PCR, como técnica de rastreio eficaz na confirmação preliminar de sorovares patogénicos, dada a possibilidade de isolamento de estirpes de patogenicidade intermédia (e.g., *L. inadai*) em

humanos e saprófitas (*e.g.*, do sorogrupo Semaranga) em roedores (Collares-Pereira, dados não publicados). No que se refere à sequenciação, os dez isolados humanos foram identificados como pertencentes às espécies *L. interrogans* sensu stricto e *L. borgpetersenii*, ou seja, em concordância com os resultados da diferenciação molecular (PCR-G1/G2; PCR-iRep1) e antigénica (anti-soros hiperimunes e anticorpos monoclonais), respectivamente ao nível do sorogrupo do complexo de *L. interrogans* s.l. (Icterohaemorrhagiae ou Ballum) e do sorovar patogénico (Copenhageni ou Arborea). Estes resultados estão igualmente de acordo com os perfis sorológicos predominantes em doentes hospitalizados na ilha de São Miguel, desde 1992⁹⁸.

O estudo molecular dos isolados murinos contribuiu para consolidar o conhecimento acerca da identidade das estirpes circulantes em roedores de São Miguel e identificar os principais responsáveis pela transmissão potencial de leptospiros patogénicas ao Homem. Numa primeira fase, confirmou-se a inclusão das 257 culturas de rim analisadas, através da aplicação do PCR-G1/G2, no complexo *L. interrogans* s.l.. Este tipo de abordagem foi recentemente adoptado na identificação da patogenicidade de isolados obtidos de roedores capturados na Índia⁷³. Em 2002, Noubade e colaboradores também o aplicaram com sucesso na diferenciação de leptospiros provenientes de diversas fontes (água, solo, fluidos corporais e tecidos renais)⁶⁶. Paralelamente, os dados obtidos por sequenciação e relativos a 8,2% (N=21) das estirpes murinas em estudo permitiram a identificação da espécie genómica *L. borgpetersenii*. Estes achados foram concordantes com os da respectiva diferenciação molecular pelo PCR-iRep1 (sorogrupo Ballum).

Com efeito, a aplicação do PCR-iRep1 tornou possível a diferenciação de isolados humanos e murinos, como já demonstrado^{9,80}. Os resultados obtidos para os 257 roedores com cultura de rim positiva confirmaram a circulação dos mesmos sorogrupos identificados nos

doentes com suspeita de Leptospirose, diferenciando-se 76 (29,6%) isolados Icterohaemorrhagiae (10 em *Mus musculus*, 40 em *R. rattus* e 26 em *R. norvegicus*) e 181 (70,4%) isolados Ballum (112 em *Mus musculus*, 60 em *R. rattus* e 9 em *R. norvegicus*). A prevalência discrepante verificada entre os dois sorogrupos detectados nos roedores é consequência da elevada percentagem (47,5%) de animais capturados da espécie *Mus musculus* (122 em 257), considerada um reservatório “de eleição” do sorovar Arborea (sorogrupo Ballum) nas ilhas Açorianas^{26,27}. A referida associação preferencial parece resultar do elevado grau de adaptação do ratinho-caseiro a este sorovar como já sugerido^{10,27,57}. A contribuir também para esta elevada percentagem de isolados Ballum estão os indivíduos da espécie *R. rattus*, que apresentaram uma taxa de infecção de 60% (60 em 100 analisados) por estirpes deste sorogrupo. A importância deste roedor, enquanto portador crónico e hospedeiro de manutenção de leptospiros do sorogrupo Ballum, está certamente associada à sua ampla distribuição e partilha de habitats com o ratinho doméstico, *M. musculus*, nas ilhas em estudo²⁹. No que se refere, ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, este foi particularmente identificado em roedores do género *Rattus*, sobretudo na espécie *R. norvegicus* (74,3%; 26/35), cuja dispersão está muito limitada aos ambientes domésticos e peri-domésticos^{27,28,38}.

Admite-se que a reduzida diversidade de sorovares patogénicos circulantes, na população murina do Arquipélago dos Açores, seja consequência do número muito reduzido de mamíferos (terrestres) silváticos, passíveis de serem reservatórios de leptospiros: apenas os três roedores já referidos e o insectívoro *Erinaceus europaeus* (ouriço-cacheiro)⁵⁸. Na presente investigação, a análise molecular (PCR-iRep1) de um isolado obtido deste último animal, previamente identificado como *L. interrogans* sensu stricto²⁵, confirmou um perfil do sorogrupo Icterohaemorrhagiae análogo ao diferenciado em roedores, o que corrobora não só

a partilha de habitats entre estas espécies animais, como sugere a reduzida diversidade acima referida.

Assim, o PCR-iRep1 permitiu a diferenciação rápida, simples e segura de um número elevado de isolados, revelando-se uma ferramenta de utilidade potencial na caracterização dos sorogrupos dos sorovares circulantes, em surtos epidémicos, através da produção de bandas distintas, reprodutíveis e sorogrupo-específicas. Deverá contudo salientar-se que a concentração e qualidade da amostra de DNA foram factores determinantes na obtenção e reprodutibilidade dos perfis obtidos. Acresce ainda o facto deste método não permitir distinguir as estirpes ao nível do sorovar infectante, o que implica outro tipo de abordagens, dada a importância epidemiológica em obter-se este tipo de informação⁹. Nas condições de trabalho do presente estudo, obtiveram-se perfis distintos para duas estirpes do sorogrupo Sejroe (M84 e Hardjo-bovis); a confirmar-se esta evidência, tal poderá estar associado ao facto destas estirpes estarem incluídas em duas espécies genómicas diferentes, apesar de pertencerem a dois sorovares do mesmo sorogrupo⁵².

O estudo da resposta imunológica anti-*Leptospira* em roedores silváticos, em particular do Género *Rattus*, demonstrou uma correlação acentuada entre a infecção por *Leptospira* (exame bacteriológico) e a presença de aglutininas específicas (sorologia). Com efeito, 74 (57,8%) dos 128 animais positivos por cultura (na sua maioria *Rattus sp.*, n=73), em que foi confirmada a identidade do agente zoonótico, apresentaram títulos reactivos $\geq 1:40$ com $TGM_{RattusIctero}=306$ e $TGM_{RattusBal}=261$; um valor de Kappa superior a 0,81 confirmou a concordância acentuada entre os dois testes desenvolvidos, PCR-iRep1 e TAM. Este achado vem confirmar, de uma forma sustentada, duas informações importantes: i) a pesquisa de anticorpos específicos, pela técnica de referência foi indicadora do sorogrupo, em 81% (60/74) dos animais analisados, ou seja, com um elevado índice de especificidade em

amostras únicas de soro; e *ii*) os roedores do género *Rattus* da ilha de São Miguel apresentam uma sororeactividade com significado epizootiológico, como já sugerido para a ilha Terceira²⁷.

A resposta humoral às infecções renais por Ballum e Icterohaemorrhagiae *versus* obtenção dos respectivos isolados foi consistente com a evidência de títulos geométricos médios (globais) mais elevados nos animais com cultura positiva (TGM=275) do que os obtidos em roedores com um resultado negativo por cultura (TGM=148). Embora a presença de uma resposta sorológica, nos portadores renais de leptospiras, seja considerada (em regra) como mais moderada e não sendo sinónimo de “infecção”, dado o equilíbrio biológico que se estabelece entre a bactéria e o hospedeiro de manutenção^{36,93}, a evidência de uma resposta imunológica numa percentagem elevada (75,3%) de roedores de São Miguel (403 em 535), dos quais 64,3% (259 em 403) comprovadamente infectados, poderá ser devida a uma estimulação hiperantigénica do respectivo sistema imunitário, na presença de populações de roedores altamente susceptíveis e de condições ambientais (*e.g.*, temperatura e humidade) favoráveis à transmissão de leptospiras, características de áreas endémicas^{26,27,49}. De realçar ainda que um resultado negativo por cultura poderá estar relacionado com a presença de contaminantes, deficiências técnicas do procedimento e/ou menor concentração do inóculo inicial, pelo que não significa, por si só, ausência do estado de portador renal.

Em regra, os títulos geométricos médios obtidos para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae foram mais elevados, do que os detectados para o sorogrupo Ballum, independentemente do resultado (positivo / negativo) da cultura de rim e da espécie de roedor (*R. rattus* e *R. norvegicus*), o que está de acordo (entre outros factores) com o carácter mais imunogénico dos sorovares do referido sorogrupo³⁷ e, em particular, do sorovar Copenhageni (Collares-Pereira, dados não publicados). De salientar igualmente a ocorrência de uma reactividade

anti-Icterohaemorrhagiae mais elevada (TGM=750) em animais da espécie *R. norvegicus* com cultura negativa, quando comparada com a obtida para o sorogrupo Ballum (TGM=159), na mesma espécie de roedor. Esta evidência, além de demonstrar a referida maior imunogenicidade do sorovar isolado (Copenhageni), contraria a noção generalizada da presença de uma resposta imune mais moderada ou mesmo inexistente nos reservatórios de eleição³⁶. Face à ausência do respectivo isolado (cultura negativa) e à em regra curta duração da resposta imune no reservatório silvático, admite-se que os títulos detectados correspondam a infecções recentes e/ou em animais mais jovens^{27,38,93}.

Por último, a presença de roedores (*Rattus sp.*) com cultura de rim positiva e sem anticorpos específicos foi observada em 32 (11,0%) dos 291 animais em que foi isolado o agente, à semelhança de outros estudos que referem as limitações da sorologia na determinação do estado de portador renal^{18,27,73}. Com efeito, as leptospiras estão protegidas nos rins contra a acção dos anticorpos, podendo deste modo permanecer por mais tempo no organismo e, no caso dos roedores, por toda a vida, sem progressão para a doença^{36,51,61}. Por este motivo, a ausência de um título de aglutinação nestes animais não significa que o roedor não é portador crónico, mas sim que, apesar de estar infectado não apresenta títulos detectáveis de aglutininas específicas³⁶.

Em conclusão, o exame bacteriológico por cultura (isolamento “*in vitro*”) é fundamental na avaliação do papel dos roedores na manutenção dos agentes de doença e o resultado da sorologia, em espécies “reservatório” de áreas endémicas, deve ser apenas considerado como uma abordagem complementar, uma vez que a presença/ausência de anticorpos não é esclarecedora (por si só) do estado de portador renal, como foi demonstrado.

6. Considerações finais / Conclusões

Os dados obtidos no âmbito desta investigação permitiram: *i*) identificar quais as estirpes prevalentes e de maior patogenicidade para o Homem em São Miguel, a ilha de maior densidade populacional do Arquipélago dos Açores; *ii*) incrementar a sensibilidade das técnicas de diagnóstico laboratorial pela introdução de estirpes locais no painel de antigénios mantidos “*in vitro*” para o diagnóstico de rotina nesta área endémica; *iii*) aplicar uma abordagem molecular mais rápida, simples e segura, para a diferenciação molecular de centenas de isolados de *Leptospira sp.*, ao nível do sorogrupo (PCR-iRep1), reduzindo substancialmente os custos em tempo e em recursos, humanos e materiais; e, de uma forma indirecta, e ainda a desenvolver, *iv*) integrar a identificação microbiológica dos agentes causais da leptospirose humana e animal, com os dados da dispersão e índices de abundância dos roedores, em termos das áreas e dos factores de risco de transmissão das leptospirosas circulantes em São Miguel.

Em conclusão, o presente estudo caracterizou os primeiros isolados humanos de *Leptospira* nos Açores e representou um marco epidemiológico ao evidenciar pela primeira vez a conexão bacteriológica entre a infecção por *Leptospira* no Homem e os roedores. A análise efectuada e os estudos dela decorrentes irão contribuir para uma actuação mais dirigida em termos de medidas de prevenção e controlo ao nível dos principais reservatórios silváticos, através do estabelecimento de áreas de risco. A caracterização dos sorovares isolados, do ponto de vista genético e antigénico, bem como a respectiva interacção com o hospedeiro humano, contribuirão (projecto a iniciar) para a investigação da susceptibilidade genética à Leptospirose da população de São Miguel, onde a doença constitui um problema de Saúde Pública, quer pelo crescente número de casos, quer pela gravidade clínica dos mesmos.

Referências bibliográficas

1. **Adler, B., de la Pena Moctezuma, A.** 2009. *Leptospira* and Leptospirosis. Veterinary Microbiology. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
2. **Ahmad, S. N., Shah, S., Ahmad, F. M. H.** 2005. Laboratory diagnosis of Leptospirosis, Journal of Postgraduate Medicine. 51: 195-200.
3. **Ahmed, N., Devi, S. M., Valverde, M. L., Vijayachari P., Machang'u, R. S., Ellis, W. A., Hartskeerl, R. A.** 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 5: 28-38.
4. **Alkami Quick Guide for PCR.** 1999. A laboratory reference for the polymerase chain reaction. Alkami Biosystems, Inc. USA. First Edition. Volume I. 78 pp.
5. **Armas, J. B., Rego, A., Gregório, A., Rosa, A. B., Freitas, S.** 1986. Leptospirose: revisão teórica e apresentação de dados clínicos. Jornal Médico. 121: 210-213.
6. **Auran, N. E., Johnson, R. C., Ritzi, D. M.** 1972. Isolation of the outer sheath of *Leptospira* and its immunogenic properties in hamsters. Infection and Immunity. 5: 968-975.
7. **Azevedo, J. F., Palmeiro, J. M.** 1972. O diagnóstico laboratorial das leptospiroses em Portugal. Anais da Escola Nacional de Saúde Pública e Medicina Tropical. 6: 89-94.
8. **Bal, A. E., Gravekamp, C., Hartskeerl, R. A., De Mezza-Brewster, J., Korver, H., Terpstra, W. J.** 1994. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of Leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology. 32: 1894-1898.
9. **Barochii, M. A., Ko, A. I., Ferrer, S. R., Faria, M. T., Reis, M. G., Riley, L. W.** 2001. Identification of new repetitive elements in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and

its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. Journal of Clinical Microbiology. 39: 191-195.

10. **Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Mathias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., Vinetz, J. M.** 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infectious Diseases. 3: 757-777.
11. **Boursaux-Eude, C., Saint Girons, I., Zuerner, R.** 1998. *Leptospira* genomics. Electrophoresis. 19: 589-592.
12. **Brenner, D. J., Kaufmann, A. F., Sulzer, K. R., Steigerwalt, A. G., Rogers, F. C., Weyant, R. S.** 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. International Journal of Systematic Bacteriology. 49: 839-858.
13. **Brown, P. D., Gravekamp, C., Carrington, D. G., van de Kemp, H., Hartskeerl, R. A., Edwards, C. N., Reverard, C. O., Terpstra, W. J., Levett, P. N.** 1995. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of Leptospirosis. Journal of Medical Microbiology. 43: 110-114.
14. **Brown, P. D., Levett, P. N.** 1997. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. Journal of Medical Microbiology. 46: 173-181.
15. **Bulach, D. M., Zuerner, R. L., Wilson, P., Seemann, T., McGrath, A., Cullen, P. A., Davis, J., Johnson, M., Kuczek, E., Alt, D. P., Peterson-Burch, B., Coppel, R. L., Rood, J. I., Davies, J. K., Adler, B.** 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A. 103: 14560-14565.

16. **Cacciapuoti, B., Ciceroni, L., Hookey, J. V.** 1993. Chromosomal rearrangement and serovar conversion in *Leptospira biflexa* strains. Zentralblatt für Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology. 278: 479-499.
17. **Caldeira, R., Gonçalves, L., Figueiredo, F., Gonçalves, A., Melo Mota, F., Paiva, C., Rosa, A., Adrahi, W., Madruga, A., Vieira, M. L., Collares-Pereira, M.** 2007. A Leptospirose e o género Masculino: um estudo retrospectivo nos Açores. V Congresso Nacional de Epidemiologia, 14 - 16 Novembro, Lisboa.
18. **Carter, M. E., Cordes, D. O.** 1980. Leptospirosis and other infections of *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*. New Zealand Veterinary Journal. 28: 45-50.
19. **Chen, T.** 1985. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of vaccine production in China. Japanese Journal of Bacteriology. 40: 755-762.
20. **Cinco, M., Banfi, E., Schonberg, A., Chris E. R.** 1987. Classification of seven *Leptospira* water strains by classic methods and identification of three new serovars. International Journal of Systematic Bacteriology. 37: 296-297.
21. **Collares-Pereira, M.** 1991. Bovine leptospirosis in cattle in Portugal: bacteriological and serological findings. The Veterinary Record. 128: 549-550.
22. **Collares-Pereira, M.** 1992. Contribuição para o estudo do Género *Leptospira* em Portugal. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa. 300 pp.
23. **Collares-Pereira, M.** 1994. *Leptospira* e Leptospiroses – Epidemiologia e diagnóstico laboratorial (parte 1) In *Cadernos de doenças Infecciosas*. 3:23-28. Edição Clínica de doenças infecciosas e parasitárias. Faculdade de Medicina de Lisboa. 74 pp.
24. **Collares-Pereira, M., Gomes, A. C., Prasad, M., Vaz, R. G., Ferrinho, P. M., Rosário, V. E.** 1997. Preliminary survey of Leptospirosis and Lyme disease amongst febrile patients

attending community hospital ambulatory care in Maputo, Mozambique. *Central African Journal of Medicine*. 43: 234-237.

25. **Collares-Pereira, M., Korver, H., Cao-Thi, B. V., Santos-Reis, M., Bellenger, E., Baranton, G., Terpstra, W. J.** 2000. Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. *FEMS Microbiology Letters*. 85: 181-187.
26. **Collares-Pereira, M., Korver, H., Terpstra, W., Santos-Reis, M., Ramalhinho, M., Mathias, M., Oom, M. M., Fons, R., Libois, R., Petrucci-Fonseca, F.** 1997. First epidemiological data on pathogenic leptospires isolated on the Azorean islands. *European Journal of Epidemiology*. 13: 435-441.
27. **Collares-Pereira, M., Mathias, M. L., Santos-Reis, M., Ramalhinho, M. G., Duarte-Rodrigues, P.** 2000. Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). *European Journal of Epidemiology*. 16: 1151-7.213423.
28. **Collares-Pereira, M., Mathias, M. L., Soares, S., Bacellar, F., Alves, M. J., Santos-Reis, M., Ramalhinho, M. G., Oom, M. M., Flor, F., Matos, J., Ferraz de Carvalho, G., Petrucci-Fonseca, F., Filipe, A.** 1997. Agentes zoonóticos associados aos mamíferos silvestres no Arquipélago dos Açores. *Açoreana*. 8: 339-357.
29. **Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Gonçalves, L., Vieira, M. L., Flor, L.** Eds. 2008. *Epidemiology and Control of Leptospirosis in the Azores. Final Scientific Report (USA Scientific Cooperative Agreement N° 58-401-3-F185, 2003-2008)*. Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme e Unidade de Epidemiologia e Bioestatística do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa / Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa / Laboratório Regional de Veterinária, Direcção Regional do Desenvolvimento Agrário (Angra do Heroísmo). Lisbon. 26 pp.
30. **Collares-Pereira, M., Vieira, M. L.** 2001. Fatal leptospirosis, Azores islands. *Weekly Epidemiological Record*. 15: 109-111.

31. **El Jalii, I., Bahaman, A. R.** 2007. Characterization of leptospiral isolates using random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Veterinarski Arhiv* 77: 159-165.
32. **Ellinghausen, H. C., McCullough, W. G.** 1965. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractions of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *American Journal of Veterinary Research*. 26: 45-51.
33. **Ellis, T., Imrie, A., Katz, A. R., Effler, P. V.** 2008. Underrecognition of Leptospirosis During a Dengue Fever Outbreak in Hawaii, 2001-2002 *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8: 541-548.
34. **Ellis, W. A., Montgomery, J. M., Thiermann, A. B.** 1991. Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of *Leptospira interrogans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 957-961.
35. **Ellis, W. A., Songer, J. G, Montgomery, J., Cassells, J. A.** 1986. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *Veterinary Record*. 118:11-13.
36. **Ellis, W.A.** 1986. Leptospirosis. *Journal of Small Animal Practice*. 27: 683-692.
37. **Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P.** 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd edition. MediSci Writing, Armadale Vic, Australia.
38. **Faria, M. T., Calderwood, M. S., Athanazio, D. A., McBride, A. J. A., Hartskeerl, R. A., Pereira, M. M., Ko., A. I., Reis, M. G.** 2008. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Tropica*. 108: 1-5.
39. **Gravekamp, C., Van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G. J., Van Eys, G. J. J. M., Reverard, C. O., Hartskeerl, R. A., Terpstra, W. J.** 1993. Detection of

seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. Journal of General Microbiology. 139: 1691-1700.

40. **Hadad, E., Pirogovsky, A., Bartal, C., Gilad, J., Barnea, A., Yitzhaki, S., Grotto, I., Balicer, R. D., Schwartz, E.** 2006. An outbreak of Leptospirosis among Israeli troops near the Jordan River. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 74: 127-131.
41. **Herrmann, J. L., Bellenger, E., Perolat, P., Baranton, G., Saint-Girons, I.** 1992. Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. Journal of Clinical Microbiology. 30: 1696–1702.
42. **Holt, S. C.** 1978. Anatomy and Chemistry of spirochetes. Microbiological reviews. 114-160.
43. **Hovind - Hougen, K.** 1981. Morphologie des leptospires. Médecine et Maladies Infectieuses. 11. 60-70.
44. **Johnson, R. C., Harris, V. G.** 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. Journal of Bacteriology. 94: 27–31.
45. **Johnson, R. C., Rogers, P.** 1964. Differentiation of pathogenic and saprophytic Leptospires with 8-Azaguanine. Journal of Bacteriology. 88: 1618–1623.
46. **Johnson, R. C., Rogers, P.** 1964. 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of leptospires. Journal of Bacteriology. 87: 422-426.
47. **Kmety, E., Dikken, H.** 1993. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press. Groningen. The Netherlands. 104 pp.
48. **Ko, A. I., Reis, M. G., Dourado, C. R., Johnson, W., Riley, L.** 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. The Lancet. 354: 820-825.

49. **Kositantont, U., Naigowit, P., Invithaya, A., Singchai, C. M., Puthavathana, P.** 2003. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in rodents and shrews trapped in low and high endemic areas in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 86:136-142.

50. **Landis, J. R., Koch, G. G.** 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33: 159-174.

51. **Langoni, H., Souza, L. C., Da Silva, A. V., Cunha, E. P., Silva, R. C.** 2008. Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 45: 190-199.

52. **Levett, P. N.** 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 14: 296-326.

53. **Levett, P. N., Morey, R. E., Galloway, R. L., Turner, D. E., Steigerwalt, A. G., Mayer, L. W.** 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 54: 45-49.

54. **Levett, P. N., Smythe, L.** 2008. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 1049–1050.

55. **Machang'u, R. S., Mgode, G. F., Assenga, J., Mhamphi, G., Weetjens, B., Cox, C., Verhagen, R., Sondij, S., Goris, M. G., Hartskeerl, R. A.** 2004. Serological and molecular characterization of *Leptospira* serovar Kenya from captive African giant pouched rats (*Cricetomys gambianus*) from Morogoro Tanzania. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 41: 117-121.

56. **Martínez, R., Perez, A., Quinones, M. C., Cruz, R., Alvarez, A., Armesto, M., Fernandez, C., Menendez, J., Rodrigues, I., Baro, M., Diaz, M., Rodrigues, J., Sierra, G., Obregon, A. M., Toledo, M. E., Fernandes, N.** 2004. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. *Revista Panamericana Salud Publica*. 15: 249-255.

57. **Mathias, M. A., Levett, P. N.** 2002. Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. *West Indian Medical Journal*. 51: 10-13.

58. **Mathias, M. L., Ramalhinho, M. G., Santos-Reis, M., Petrucci-Fonseca, F., Libois, R., Fons, R., Ferraz de Carvalho, G., Oom, M. M., Collares-Pereira, M.** 1998. The terrestrial mammals from the Azores islands: an updated overview. *Mammalia*, 62: 397-407.

59. **McBride, A. J. A., Athanazio, D. A., Reis, M. G., Ko, A. I.** 2005. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 18: 376-386.

60. **McGuire, C. D., Myers, D. M.** 1957. Leptospirosis in Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 6:532-539.

61. **Meerburg, B. G., Singleton, G. R.** 2009. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology*. 35: 221-270.

62. **Meites, E., Jay, M. T., Deresinski, S., Shieh, W., Zaki, S. R., Tompkins, L., Smith, D. S.** Reemerging Leptospirosis. 2004. *Emerging Infectious Diseases*. 10: 406-412.

63. **Morey, R. E., Galloway, R. L., Bragg, S. L., Steigerwalt, A. G., Mayer, L. W., Levett, P. N.** 2006. Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 3510–3516.

64. **Nascimento, A. L., Verjovski-Almeida, S., van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Digiampietri, L. A., Harstkeerl, R. A., Marques, M. L., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Haake, D. A., Martins, E. A. L.** 2004. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37: 459-478.

65. **Natarajaseenivasan, K., Prabhu, N., Selvanayagi, K., Savalaikarankulam, S., Raja, S., Ratnam, S.** 2004. Human Leptospirosis in Erode, South India: Serology, isolation and

characterization of the isolates by Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. Japanese Journal of Infectious Disease. 57: 193-197.

66. **Noubade, R., Krishnamurthy, S., Murag, S., Venkatesha, M. D., Krishnappa, G.** 2002. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires by polymerase chain reaction. Indian Journal of Medical Microbiology. 20: 33-36.
67. **Pacheco, M., Paiva, C., Collares-Pereira, M., Vieira, M. L., Melo Mota, F.** 2000. Contribuição para o estudo integrado da Leptospirose humana e animal na Ilha de São Miguel. Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas. 23: 77-84.
68. **Palaniappan, R. U. M., Chang, Y., Chang, C., Pan, M. J., Yang, C. W., Harpending, P., McDonough, S. P., Dubovi, E., Divers, T., Qu, J., Roe, B.** 2005. Evaluation of *lig*-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Molecular and Cellular Probes. 19: 111-117.
69. **Panaphut, T., Domrongkitchajporn, S., Vibhagool, A., Thinkamrop, B., Susaengrat, W.** 2003. Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. Clinical Infectious Diseases. 36: 1507-1513.
70. **Perolat, P., Merien, F., Ellis, W. A., Baranton, G.** 1994. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. Journal of Clinical Microbiology. 32: 1949-1957.
71. **Perret, C. P., Abarca, K. V., Dabanch, J. P., Solari, V. G., García, P. C., Carrasco, S. L., Olivares, R. C., Avalos, P.** 2005. Risk factors and frequency of positive antibodies for leptospirosis in a sub urban population near Santiago. Revista Médica de Chile. 133: 426-431.
72. **Picardeau, M., Bulach, D., Bouchier, C., Zuerner, R., Zidane, N., Wilson, P. J., Creno, S., Kuczek, E. S., Bommezzadri, S., Davis, J. C., McGrath, A., Johnson, M. J., Boursaux-Eude, C., Seemann, T., Rouy, Z., Coppel, R. L., Rood, J. I., Lajus, A., Davis, J. K., Médigue, C., Adler, B.** 2008. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa*

provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of Leptospirosis. PLoS ONE 3(2):e1607. doi: 10.1371/journal.pone.0001607.

73. **Prya, C. G., Hoogendijk, K. T., Berg, M. V. D., Rathinam, S. R., Ahmed, A., Muthukkaruppan, V. R., Hartskeerl, R. A.** 2007. Field rats form a major infection source of leptospirosis in and around Madurai, India. Journal of Postgraduate Medicine. 53: 236-240.
74. **Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donely, W. J., Leonard, F. C.** 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 1st edition. Oxford: Blackwell Science.
75. **Ralph, D., McClelland, M., Welsh, J., Baranton, G., Perolat, P.** 1993. *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. Journal of Bacteriology. 175: 973–981.
76. **Ramdass, P., Latha, D., Senthilkumar, A., Srinivasan, P., Saranya, N.** 2002. Arbitrarily primed PCR – a rapid and simple method for typing of leptospiral serovars. Indian Journal of Medical Microbiology. 20: 25–28.
77. **Reis, R. B., Ribeiro, G. S., Felzemburgh, R. D. M., Santana, F. S., Mohr, S., Melendez, A., Queiroz, A., Santos, A. C., Ravines, R. R. Tassinari, W. S., Carvalho, M. S., Reis, M. G., Ko, A. I.** 2008 Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. PLoS Neglected Tropical Diseases 2(4): e228. doi:10.1371/journal.pntd.0000228.
78. **Ren, S. X., Gang, F., Jiang, X. G., Zeng, R., Miao, Y. G., Xu, H., Zhang, Y. X., Xiong, H., Lu, G., Lu, L. F., Jiang, H. Q., Jia, J., Tu, Y. F., Jiang, J. X., Gu, W. Y., Zhang, Y. I., Cai, Z., Sheng, H. H., Yin, H. F., Zhang, Y., Zhu, G. F., Wan, M., Huang, H. L., Qian, Z., Wang, S. Y., Wei, M., Yao, Z. H., Shen, Y., Qiang, B. Q., Xia, Q. C., Guo, X. K., Danchin, A., Saint Girons, I., Somerville, R. L., Wen, Y. M., Shi, M. H., Chen, Z., Xu, J. G., Zhao, G. P.** 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira* interrongans revealed by whole-genome sequencing. Nature. 422: 888-892.

79. **Rocha, T.** 1998. Leptospirose bovina na ilha Terceira. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 83: 97-101.
80. **Romero, E. C., Yasuda, P. H.** 2006. Molecular characterization of *Leptospira sp.* strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101: 373-378.
81. **Sambasiva, R. R., Naveen, G., Bhalla, P., Agarwal, S. K.** 2003. Leptospirosis in India and the rest of the World. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 7: 178-193.
82. **Sehgal, S. C., Sugunam, A. P., Murhekar, M. V., Sharma, S., Vijayachari, P.** 2000. Randomised controlled trial of doxycycline and prophylaxis in an endemic area. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 13: 249-255.
83. **Sharma, S., Vijayachari, P., Sugunan, A. P., Natarajaseenivasan, K., Sehgal, S.** 2006. Seroprevalence of Leptospirosis among High-Risk population of Andaman Islands, India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 74: 278-283.
84. **Slack, A. T., Symonds, M. L., Dohnt, M. F., Smythe, L. D.** 2006. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998-2004. *Epidemiology and Infection*. 11: 1-9.
85. **Sokal, R. R., Rohlf, F. J.** 1969. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 776 pp.
86. **Stimson, A. M.** 1907. Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Reports*. 22: 541.
87. **Suarez-Hernandez, M., Sanches, R. M., Fernandez, P. E. P., Vidal Garcia, I., Bravo Fleites, F., Sibello, A. S.** 1999. Brotes de leptospirosis humana en la provincia de Ciego de Avila, Cuba. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 32:13-18.

88. **Suputtamongkol, Y., Niwattayakul, K., Suttinont, C., Losuwanaluk, K., Limpai boon, R., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Triengrim, S., Chenchittikul, M., White, N. J.** 2004. An open, randomized, controlled trial of penicillin, doxycycline, and cefotaxime for patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*. 39: 1417-1424.

89. **Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. 2007. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.

90. **Taylor, G.R.** 1993. Polymerase Chain Reaction: basic principles and automation. In: McPherson, M. J., Quirke, P., Taylor, G. R. *PCR: a practical approach*. New York: Oxford University Press. p. 1-13.

91. **Trevejo, R. T., Rigau-Pérez, J. G., Ashford, D. A., McClure, E. M., Jarquín-González, C., Amador, J. J., de los Reyes, J. O., Gonzalez, A., Zaki, S. R., Shieh, W., McLean, R. G., Nasci, R. S., Weyant, R. S., Bolin, C. A., Bragg, S. L., Bradley, A. P., Spiegel, R. A.** 1998. Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage-Nicaragua, 1995. *The Journal of Infectious Diseases*. 178: 1457-1463.

92. **Turner, L. H.** 1967. Leptospirosis I. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 61: 842-855.

93. **Twigg, G. I., Cuerden, C. M., Hughes, D. M.** 1968. Leptospirosis in British wild mammals. *Symposium of Zoological Society of London*. 24: 75-78.

94. **Urquhart, A., Grant, L., Sulzer, C.** 1973. A new leptospiral serotype belonging to serogroup Icterohaemorrhagiae. *Journal of Wildlife Diseases*. 9: 254-257.

95. **Victoria, B., Ahmed, A., Zuerner, R. L., Ahmed, N., Bulach, D. M., Quintero, J., Hartskeerl, R. A.** 2008. Conservation of the *S10-spc-α* locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the Genus *Leptospira*. *PLoS ONE*, 3(7): e2752.doi:10.1371/journal.pone.0002752.

96. **Videira, A.** 2001. Engenharia Genética: Princípios e Aplicações. Lidel. Edições Técnicas, Lda.
97. **Vieira, M. L.** 2006. Aspectos da caracterização antigénica e molecular da Leptospirose em áreas endémicas. Dissertação de Doutoramento no Ramo de Ciências Biomédicas. Especialidade de Microbiologia pela UNL/IHMT Lisboa.
98. **Vieira, M. L., Gama-Simões, J. M., Collares-Pereira, M.** 2006. Human Leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *International Journal of Infectious Diseases*. 10: 378-386.
99. **Vijayachari, P., Sugunan, A. P., Shiriram, A. N.** 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of Biosciences*. 33: 557-569.
100. **Wang, Z., Jin, L., Wegrzyn, A.** 2007. Leptospirosis vaccines. *Microbial Cell Factories*. 6: 39. doi:10.1186/1475-2859-6-39.
101. **World Health Organization.** 2003. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. 1st edition. International Leptospirosis Society (ILS). 109 pp.
102. **Yan, Y., Chen, Y., Liou, W., Ding, J., Chen, J., Zhang, J., Zhang, A., Zhou, W., Gao, Z., Ye, X., Xiao, Y.** 2003. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to *Leptospira*. *Journal of the Chinese Medical Association*. 66: 224-230.
103. **Yasuda, P. H., Steigerwalt, A. G., Sulzer, K. R., Kaufmann, A. F., Rogers, F., Brenner, D. J.** 1987. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37: 407-415.

104. **Yersin, C., Bovet, P., Mérien, F., Wong, T., Panowsky, J., Perolat, P.** 1998. Human Leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population base study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 59: 933-940.
105. **Zuerner, R. L., Haake, D., Adler, B., Segers, R.** 2000. Technological Advances in the Molecular Biology of *Leptospira*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2: 455-462.
106. **Zuerner, R. L., Herrmann, J. L., Saint-Girons, I.** 1993. Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. *Journal of Bacteriology*. 175: 5445-5451.

Anexos

Anexo I – Hemoculturas

Objectivo: Isolamento de leptospiros por hemocultura em doentes com suspeita de Leptospirose.

Equipamento e consumíveis (reagentes, material biológico e material descartável):

- Incubadora orbital
- Micropipeta (100-1000 µl)
- Frasco de hemocultura pediátrico (*BACTEC, Peds Plus/F, BD 40 ml*)
- Meio de EMJH líquido - 2 tubos de plástico estéreis com 5 ml
- Meio de EMJH semi-sólido - 2 tubos de plástico estéreis com 5 ml
- Sangue total - 2 ml / doente
- Pipetas de Pasteur estéreis

Descrição da técnica

1. Transferir cerca de 2 ml de sangue total, recolhido à cabeceira do doente, para um frasco de hemocultura pediátrico (*BACTEC, Peds Plus/F, BD 40 ml*)
2. Aguardar 1 hora à temperatura ambiente e no escuro.
3. Incubar cerca de 10% v/v para um tubo de cultura (tubo B) com meio líquido de EMJH. Agitar e retirar novamente 10% para o tubo C, também com meio líquido selectivo.
4. Esperar cerca de 1 hora, à temperatura ambiente e no escuro.
5. Retirar 8 gotas do sobrenadante para o tubo D e 12-16 gotas para o tubo E (ambos com meio de EMJH semi-sólido).
6. Incubar a 28-30°C, com agitação orbital.
7. Após 24 h e diariamente, verificar o estado da cultura e agitar, observando ao microscópio sempre que necessário ou, pelo menos, uma vez por semana. A visualização macroscópica de crescimento (através do anel de Dinger à superfície) é sugestiva de um resultado positivo, que deverá ser confirmado em microscopia de fundo escuro, para visualização das leptospiros.

Nota: a hemocultura é considerada negativa, na ausência de crescimento de leptospiros, após 16 semanas de incubação.

Anexo II - Meios de cultura

Objectivo: Preparação de meios de cultura selectivos para o isolamento e crescimento de *Leptospira*.

Equipamento e consumíveis (reagentes e material descartável):

- Câmara de fluxo laminar e Bico de Bunsen
- Dispensador automático (autoclavado)
- Autoclave
- Meio base EMJH (Difco[®])
- Suplemento para meio selectivo EMJH (Difco[®])
- Caldo nutritivo (Difco[®])
- 5-Fluorouracilo (5-FU) (Sigma[®])
- Soro de coelho (Sigma[®])
- Água destilada
- Tubos de vidro estéreis – 16x160 mm (Schott Duran[®])
- Frascos de 1 litro estéreis (Schott[®])
- Filtros de 0,8 µm, 0,45 µm e 0,22 µm
- Seringas de 20 ml

1. Meio de EMJH semi-sólido

(meio selectivo enriquecido utilizado nas fases de isolamento inicial de Leptospira spp)

- 1.1. Dissolver 1,8 g de Agar e 2,3 g do meio base EMJH (Difco[®]) em 900 ml de água destilada;
- 1.2. Autoclavar a 120°C durante 15 minutos;
- 1.3. Adicionar 100 ml do suplemento (Difco[®]), 20 ml de soro de coelho (Gibco[®]) inactivado a 56°C e 10 ml de 5-FU (filtrado) (10 mg/ml) em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada;
- 1.4. Distribuir \cong 4 ml por cerca de 250 tubos estéreis à chama em câmara de fluxo laminar.

2. Soro de coelho

(componente nutritivo suplementar adicionado ao meio de EMJH semi-sólido e, por vezes, ao meio líquido para algumas estirpes de referência)

- 2.1. Aquecer o soro de coelho (Gibco[®]) a 56°C em banho-maria durante 45 minutos.

2.2. Deixar arrefecer à temperatura ambiente e filtrar o soro de coelho com filtro estéril de 0,8 µm e depois com um filtro de 0,45µm.

2.3. Preparar aliquotas de 20 ml em tubos estéreis e congelar a -20°C.

3. Fluorouracilo (5-FU) (10 mg/ml):

(antimicrobiano/análogo pirimidínico a adicionar ao meio de EMJH semi-sólido)

3.1. Dissolver uma 1g de 5-fluoruracilo em 50 ml de água destilada.

3.2. Ajustar o pH a 7,6 com NaOH e perfazer o volume (100 ml) com água destilada.

3.3. Filtrar a solução com filtro 0,22 µm.

4. Meio de EMJH líquido

(meio de cultura selectivo para Leptospira spp)

4.1. Dissolver 2,3 g de meio base (Difco®) em 900 ml de água autoclavada;

4.2. Autoclavar a 120°C durante 15 minutos;

4.3. Adicionar 100 ml do suplemento (Difco®), em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada;

4.4. Distribuir 4 ml por 250 tubos estéreis à chama em câmara de fluxo laminar.

5. Caldo nutritivo

(utilizado como controlo de qualidade em testes de esterilidade ao meio EMJH/37°C/72h)

5.1. Dissolver 8 g de *Nutrient broth* (Difco®) em 1 litro de água destilada;

5.2. Autoclavar a 121°C durante 20 minutos;

5.3. Distribuir 4 ml por 250 tubos estéreis em câmara de fluxo laminar.

Anexo III- Testes de crescimento (fenotípicos)

Objectivo: Diferenciação preliminar da patogenicidade de isolados de *Leptospira* spp.

Equipamento e consumíveis (reagentes, material biológico e material descartável):

- Câmara de fluxo laminar e bico de Bunsen
- Incubadora a 13°C
- Incubadora a 29°-30°C, com agitação orbital
- Centrífuga
- Culturas jovens (4 a 10 dias) e densas (10^8 bactérias/ml) das estirpes a identificar
- Meio de EMJH líquido - 5ml/tubo
- 8-azaguanina (Sigma®)
- Solução de cloreto de sódio 1M
- Tubos *ependorf*® de 1,5 ml
- Tubos de vidro estéreis - 16 x 160 mm (Schott Duran®)
- Pipetas Pasteur estéreis

Descrição dos testes:

1. Teste de crescimento a 13°C

- 1.1. Preparar culturas jovens (4 a 10 dias) e densas (10^8 bactérias/ml) das estirpes a identificar;
- 1.2. Inocular 1 ml de cada cultura em 5 ml de meio EMJH líquido (Difco®);
- 1.3. Colocar os tubos numa incubadora à temperatura de 29°C;
- 1.4. Inocular 1 ml de cada cultura em 5 ml de meio EMJH líquido (Difco®);
- 1.5. Colocar os tubos numa incubadora à temperatura de 13°C;
- 1.6. Efectuar a observação microscópica de 3 em 3 dias durante 15 dias.

2. Teste de sensibilidade à 8-azaguanina (225µg/ml)

- 2.1. Preparar culturas jovens (4 a 10 dias) e densas (10^8 bactérias/ml) das estirpes a identificar;
- 2.2. Inocular 1 ml de cada cultura em 5 ml de meio EMJH líquido (Difco®);
- 2.3. Inocular 1 ml de cada cultura em 5 ml de meio EMJH líquido (Difco®) com 8-azaguanina (225µg/ml);
- 2.4. Colocar os tubos numa incubadora à temperatura de 29°C;
- 2.5. Efectuar a observação microscópica de 3 em 3 dias durante 15 dias.

3. Teste do cloreto de sódio 1M

- 3.1. Centrifugar 1 ml de uma cultura jovem (4 a 10 dias) e densa (10^8 bactérias/ml) a 10.000 g durante 4 minutos à temperatura ambiente;
- 3.2. Descartar o sobrenadante;
- 3.3. Ressuspender em igual volume de NaCl 1M;
- 3.4. Aguardar 2-3 horas à temperatura ambiente;
- 3.5. Observar em microscópio de fundo escuro.

Bibliografia

Johnson, R. C., Harris, V. G. 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. I. Growth at low temperatures. *Journal of Bacteriology*. 94: 27-31.

Johnson, R. C., Rogers, P. 1964. Differentiation of pathogenic and saprophytic Leptospire with 8-Azaguanine. *Journal of Bacteriology*. 88: 1618-1623.

Anexo IV - Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM)

Objectivos:

- A. **Diagnóstico imunológico de rotina**, através da detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soros problema (humanos e animais);
- B. **Identificação dos isolados** ao nível do sorogrupo (com anti-soros de referência hiperimunes) e do sorovar (com anticorpos monoclonais).

Equipamento e consumíveis (reagentes, material biológico e material descartável):

- Microscópio de fundo escuro com objectiva de longa distância focal (x20) para leitura directa das microplacas
- Estufa de incubação a 37°C
- Bico de Bunsen
- Vortex
- Micropipetas - de 5 a 50 µl e multicanal
- Solução salina tamponada com fosfatos (Tampão PBS: pH 7,2-7,4)
- Antígenos vivos de referência ou isolados de *Leptospira* spp - culturas jovens com 4 a 10 dias em meio de EMJH líquido com uma densidade aproximada de 10⁸ bactérias/ml, previamente examinadas em fundo escuro para controlo da respectiva qualidade
- Tubos *ependorf*® de 1,5 ml
- Microplacas de fundo plano
- Pipetas Pasteur esterilizadas (1gota ≅ 35 µl)

Descrição da técnica

A. Diagnóstico imunológico de rotina

A.1. Rastreio das amostras de soro a analisar, em diluições baixas:

- 1) Diluir os soros a 1:20 (humanos) ou 1:10 (roedores) em tampão PBS;
- 2) Marcar as microplacas: com os antígenos, a designação atribuída a cada soro problema e as testemunhas. Na primeira etapa, de rastreio, marcar as duas diluições (humanos: 1:40 e 1:80) (roedores: 1:20 e 1:40) conforme o esquema representado (Figura A);

- 3) Adicionar 35 µl da diluição do soro problema nos poços de todos os antígenos, correspondentes às duas diluições (humanos: 1:40 e 1:80) (roedores: 1:20 e 1:40);
- 4) Adicionar 35 µl de tampão PBS em todos os poços correspondentes à diluição 1:80 (humanos) ou 1:40 (roedores), agitar com a ponta da pipeta, retirar 35µl da solução e descartar;
- 5) No poço correspondentes à testemunha, adicionar 35µl de tampão PBS;
- 6) Acrescentar igual volume de antígeno utilizando uma pipeta de Pasteur (calibrada e estéril) em todas as diluições, incluindo a testemunha;
- 7) Bater suavemente nos lados da placa para facilitar a mistura dos reagentes;
- 8) Tapar a placa e colocá-la na incubadora a 37°C durante 2 horas;
- 9) Observar as placas ao microscópio de fundo escuro, tendo como referência as testemunhas (controles negativos);

	Soro...		Soro...		Soro...		Soro...		Soro...		T
	1:20	1:40	1:20	1:40	1:20	1:40	1:20	1:40	1:20	1:40	
Ag A											
Ag B											
Ag C											
Ag D											
Ag E											
Ag F											
Ag G											
Ag H											

Figura A. Esquema ilustrativo da marcação e utilização de uma microplaca, na etapa de rastreio dos soros duvidosos e positivos.

A.2. Titulação dos soros positivos, em diluições seriadas ao dobro, como segue:

- 1) Marcar uma nova microplaca com as diluições 1:40 a 1:2560, conforme ilustrado na figura B:

	Soro	Soro	Soro	Soro	Soro	Soro	Soro	Soro	Soro	Soro
1:40										
1:80										
1:160										
1:320										
1:640										
1:1280										
1:2560										
T										

Figura B. Esquema ilustrativo da marcação e utilização de uma microplaca, na etapa de titulação dos soros positivos.

Nota: Na fase de titulação podem ser necessárias várias microplacas até ser atingido o título terminal (diluição sérica na qual estão presentes 50% de bactérias livres, quando comparado com a cultura de controlo diluída a 1:2 em tampão PBS).

- 2) Adicionar 35 µl da diluição de soro problema nos poços correspondentes às diluições 1:80 e 1:160 (humanos) e 1:40 ou 1:80 (roedores);
- 3) Adicionar 35 µl de tampão PBS em todos os poços a partir da diluição 1:160 (humanos) ou 1:80 (roedores), incluindo a testemunha;
- 4) Recolher 35µl de solução na diluição 1:160 (humanos) ou 1:80 (roedores) e transferir para a diluição seguinte (1:320 humanos e 1:160 roedores) utilizando a pipeta multicanal, repetindo o processo de transferência de volume para a diluição seguinte até à última diluição, na qual o volume é descartado;
- 5) Acrescentar igual volume de antígeno utilizando uma pipeta de pasteur calibrada em todas as diluições incluindo a testemunha;
- 6) Bater suavemente nos lados da placa para facilitar a mistura dos reagentes;
- 7) Tapar a placa e colocá-la na incubadora a 37°C durante 2 horas;
- 8) Observar as placas ao microscópio de fundo escuro, tendo como referência as testemunhas de cada antígeno (controlos negativos).

Leitura do teste

O **título final** da técnica de aglutinação microscópica corresponde à diluição sérica na qual estão presentes até 50% de bactérias livres, quando comparada com a cultura de controlo diluída 1:2 em tampão fosfato salino. A intensidade de aglutinação, por campo de observação e por comparação com o respectivo controlo negativo, está registada abaixo:

Leptospiras livres	Aglutinação	Resultado
100%	0%	Negativo
75%	25% (+)	Negativo
50%	50% (++)	Positivo
25%	75% (+++)	Positivo
0%	100% (++++)	Positivo

B. Identificação dos isolados

B.1. Soros hiperimunes

- 1) Diluir os soros hiperimunes a 1:10 em tampão PBS;
- 2) Marcar as microplacas, com os isolados a identificar, a designação atribuída a cada soro hiperimune e as testemunhas. Marcar as quatro diluições de rastreio (1:20 a 1:160) conforme a Figura A.
- 3) Adicionar 35 µl da diluição do soro hiperimune nos poços de todos os antígenos, correspondentes às quatro diluições (1:20 a 1:160);
- 4) Adicionar 35 µl de tampão PBS em todos os poços correspondentes à diluição 1:40, agitar com a ponta da pipeta, retirar 35µl da solução e descartar;
- 5) Nos poços correspondentes à testemunha, adicionar 35µl de tampão PBS;
- 6) Acrescentar igual volume de cada isolado (antígeno) a identificar utilizando uma pipeta de Pasteur (calibrada e estéril) em todas as diluições, incluindo a testemunha;
- 7) Bater suavemente nos lados da placa para facilitar a mistura dos reagentes;
- 8) Tapar a placa e colocá-la numa estufa a 37°C durante 2 horas;
- 9) Observar as placas ao microscópio de fundo escuro, tendo como referência a testemunha de cada antígeno (controlo negativo).

B.1.1. Titulação em diluições seriadas ao dobro de amostras dos soros hiperimunes com os respectivos isolados (antígenos) em que se obteve um resultado positivo para determinação do título final (Ver ponto A.2.).

B.2. Anticorpos monoclonais

- 1) Diluir os anticorpos monoclonais a 1:10 em tampão PBS;
- 2) Marcar as microplacas, com os isolados a identificar, a designação atribuída a cada soro monoclonal e as testemunhas. Na etapa da triagem, marcar as duas diluições de triagem (1:20 e 1:40) conforme a Figura A.
- 3) Adicionar 35 µl da diluição do respectivo anticorpo monoclonal, específico para cada isolado já identificado ao nível do sorogrupo, nos poços correspondentes às duas diluições (1:20 e 1:40);
- 4) Adicionar 35 µl de tampão PBS em todos os poços correspondentes à diluição 1:40, agitar com a ponta da pipeta, retirar 35µl da solução e descartar;

- 5) Nos poços correspondentes à testemunha, adicionar 35 µl de tampão PBS;
- 6) Acrescentar igual volume de cada isolado (antigénio) a identificar utilizando uma pipeta de Pasteur (calibrada e estéril) em todas as diluições, incluindo a testemunha;
- 7) Bater suavemente nos lados da placa para facilitar a mistura dos reagentes;
- 8) Tapar a placa e coloca-la numa estufa a 37°C durante 2 horas;
- 9) Observar as placas ao microscópio de fundo escuro tendo como referência a testemunha de cada antigénio (controlo negativo).

B.2.1. Titulação em diluições seriadas ao dobro de amostras dos anticorpos monoclonais com os respectivos isolados (antigénios) em que se obteve um resultado positivo na etapa anterior para determinação do título final (Ver ponto A.2.).

Bibliografia

Collares-Pereira, M. 1992. Contribuição para o estudo do Género *Leptospira* em Portugal. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa. 300 pp.

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd edition. MediSci Writing, Armadale Vic. Australia.

World Health Organization (W.H.O.). 2003. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. 1st edition. International Leptospirosis Society. 109 pp.

Anexo V – Extracção e purificação de DNA (Kit Gentra®)

Objectivo: Obter amostras de DNA de *Leptospira* spp com elevado grau de pureza.

Equipamento e consumíveis (reagentes, material biológico e material descartável):

- Câmara de fluxo laminar
- Termobloco
- Vortex
- Centrífuga
- Banho-maria
- Micropipetas
- Soluções do Kit Gentra®
- Água autoclavada
- Antígenos vivos de referência ou isolados de *Leptospira* spp - culturas jovens com 4 a 10 dias em meio de EMJH líquido com uma densidade aproximada de 10^8 bactérias/ml, previamente examinadas em fundo escuro para controlo da respectiva qualidade.
- Caixas de pontas estéreis com filtro
- Tubos *ependorf*® de 1,5 ml (estéreis)

Descrição da técnica:

1. Etapa de lise celular

- 1.1. 500 µl de várias culturas jovens e densas (4-10 dias e 10^8 bactérias/ml) foram aliquoteados para um tubo *ependorf*® de 1,5 ml em gelo.
- 1.2. Seguidamente procedeu-se à sua centrifugação a 16.000 g durante 2 minutos à temperatura ambiente para sedimentar as bactérias. Após centrifugação foi removido o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 300 µl de **Solução de lise**.
- 1.3. Depois de homogeneizar os volumes contidos nos tubos as amostras foram incubadas à temperatura de 80°C durante 10 minutos para facilitar a lise das células.

2. Tratamento com RNAase

Em seguida, efectuou-se o tratamento com **RNAase**, adicionando 1,5 µl ao lisado celular. Inverteu-se cada tubo diversas vezes e incubaram-se as amostras a 37°C no termobloco durante 30 minutos.

3. Precipitação proteica

- 3.1. Depois desta etapa deixaram-se arrefecer as amostras à temperatura ambiente e adicionaram-se 100 µl de **Solução de Precipitação Proteica** a cada tubo. As amostras foram agitadas no vortex e centrifugadas a 16.000 g durante 5 minutos à temperatura ambiente.
- 3.2. Após centrifugação, a fase aquosa das amostras contendo o DNA foi decantada cuidadosamente para outros tubos *ependorf*[®] de 1,5 ml contendo 300 µl de isopropanol 100% (2-propanol) e o sedimento de proteínas foi descartado.

4. Precipitação de DNA

- 4.1. Centrifugaram-se novamente as amostras a 16.000 g durante 3 minutos à temperatura ambiente, sendo por vezes possível visualizar o DNA como um pequeno sedimento branco no fundo dos tubos.
- 4.2. Verteram-se os sobrenadantes e adicionaram-se 300 µl de Etanol a 70% a cada amostra invertendo várias vezes os tubos para lavar o DNA.
- 4.3. Procedeu-se à última centrifugação à temperatura ambiente a 16.000 g durante 2 minutos, descartando-se de seguida o etanol e deixando os tubos secar ao ar durante 15 minutos.

5. Hidratação do DNA

Por fim, adicionaram-se 50 µl de **Solução de Hidratação** e colocaram-se os tubos no termobloco à temperatura de 65°C durante 1 hora. O DNA extraído foi guardado a 4°C ou -20°C até ser efectuada a PCR.

Nota: O procedimento foi efectuado em conformidade com as especificações do fabricante (Gentra[®]) ainda que tenham sido introduzidas pequenas alterações, nomeadamente nos tempos de centrifugação, incubação, evaporação do etanol e hidratação do DNA. Essas alterações decorreram da optimização e adaptação do protocolo à realidade do laboratório.

Anexo VI – Tampões

1. Tampão Sorensen: utilizado na preparação do tampão PBS para a técnica de aglutinação microscópica (TAM).

1.1. Adicionar 8,33 g de Na_2HPO_4 (anidro) e 1,09 g de KH_2PO_4 a 1 litro de água destilada.

1.2. Acertar o pH a 7,6 e autoclavar a 120°C durante 20 minutos

2. Tampão PBS: utilizado nas diluições dos soros “problema”, dos anti-soros hiperimunes, dos anticorpos monoclonais e como controlo de qualidade dos antígenos da TAM.

2.1. Adicionar 15,64 g de NaCl a 160 ml de Tampão Sorensen;

2.2. Perfazer para um 1 litro de água destilada;

2.3. Autoclavar a 120°C durante 15 minutos.

3. Tampão TAE (10 X): utilizado como tampão de corrida na electroforese em gel de agarose.

3.1. Adicionar 48,4 g de Tris-base , 2 g de EDTA e 10 ml de ácido acético glacial a 1 litro de água destilada.

4. Tampão TE (1X): utilizado na etapa final do método de extracção de DNA por fervura.

4.1. Dissolver 0,38 g de EDTA e 1,2 g de Tris-Base em 900 ml de água destilada;

4.2. Acertar o pH a 8,0 e perfazer para 1 litro

4.3. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Loading buffer (5X): utilizado na preparação das amostras a aplicar em gel de agarose. Facilita a sua aplicação, minimizando a possibilidade de danificar os poços e estabilizando o DNA dentro deles. O *loading buffer* utilizado foi adquirido pronto a usar (Bio-Rad® 25% Glycerol; 50mM Tris pH8,0; 0,5 mM EDTA; 0,2% bromophenol blue e 0,2% Xylene Cyanole FF).

Anexo VII - Necrópsia e cultura de rim

Objectivo: Isolar bactérias do género *Leptospira* a partir do macerado de rim de roedores silváticos.

Equipamento e consumíveis (reagentes, material biológico e material descartável):

- Incubadora orbital
- Bico de Bunsen
- Prancha de dissecação e alfinetes
- Tesoura
- Pinça
- Bisturi
- Meio BSAD (*bovine serum albumine diluent*)
- Meio de EMJH líquido – em tubos estéreis de 8-10 ml
- Meio de EMJH semi-sólido – em tubos estéreis de 8-10 ml
- Éter
- Betadine (solução)
- Algodão
- Sacos de plástico estéreis
- Pipetas de Pasteur (estéreis)

Descrição da técnica:

1. Anestesiar o roedor. Para tal introduzi-lo num saco de plástico contendo algodão embebido em éter;
2. Colocar o animal numa prancha de dissecação e distênde-lo com a ajuda de alfinetes;
3. Desinfectar a região ventral com algodão embebido em betadine;
4. Retirar a camada epitelial superior e distende-la com alfinetes;
5. Desinfectar uma tesoura e pinça passando-as por alcoól e pela chama;
6. Retirar um dos rins;
7. Colocar o rim num saco de plástico estéril contendo 10 ml de BSAD;
8. Deixar repousar aproximadamente durante 1 hora, para deixar que as leptospiras (bactérias aeróbias) se movimentem para o sobrenadante;

9. Retirar uma porção de sobrenadante para um tubo de EMJH líquido (2,5 ml) designado (-1). Proceder a uma segunda diluição em EMJH líquido (2,5 ml) a partir do (-1);
10. Deixar o tubo repousar pelo menos 1 hora;
11. Realizar a sementeira de algumas gotas em dois tubos de EMJH sólido, a partir do tubo (-2);
12. Incubar com agitação a 30°C;
13. Verificar diariamente a presença/ausência de crescimento.

Bibliografia

Collares-Pereira, M. 1992. “Contribuição para o estudo do Género *Leptospira* em Portugal”. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, 300 pp.

Anexo VIII – Cálculo dos títulos geométricos médios (TGM)

Objectivo: Cálculo dos Títulos geométricos médios (TGM) por sorogrupo e espécie de roedor (Sokal, *et al.*⁸⁵)

1. Roedores com cultura de rim positiva, em que foi efectuada a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* e a diferenciação molecular do respectivo isolado por PCR-iRep1

Tabela 1.1. TGM – sorogrupo Ballum e espécie *Rattus rattus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\text{anti} \sum \log^*n/N$
1280	2	3,1	6,2	266,07
640	6	2,8	16,8	
320	6	2,5	15	
160	12	2,2	26,4	
80	1	1,9	1,9	
40	1	1,6	1,6	
Total (N)	28		67,9	

Tabela 1.2. TGM – sorogrupo Icterohaemorrhagiae e espécie *Rattus rattus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\text{anti} \sum \log^*n/N$
2560	2	3,4	6,8	324,12
1280	5	3,1	15,5	
640	3	2,8	8,4	
320	8	2,5	20	
160	6	2,2	13,2	
40	4	1,6	6,4	
Total (N)	28			

Tabela 1.3. TGM – sorogrupo Icterohaemorrhagiae e espécie *Rattus norvegicus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\text{anti} \sum \log^*n/N$
2560	1	3,4	3,4	277,81
1280	3	3,1	9,3	
640	2	2,8	5,6	
320	3	2,5	7,5	
160	3	2,2	6,6	
80	1	1,9	1,9	
40	3	1,6	4,8	
Total (N)	16		39,1	

2. Roedores com cultura positiva e sem diferenciação molecular ao nível do sorogrupo dos respectivos isolados, em que foi efectuada a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira*

Tabela 2.1. TGM – sorogrupo Ballum e espécie *Rattus rattus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\frac{\text{anti} \sum \log^* n}{N}$
1280	1	3,1	3,1	179,99
640	6	2,8	16,8	
320	9	2,5	22,5	
160	11	2,2	24,2	
80	5	1,9	9,5	
40	6	1,6	9,6	
Total (N)	38		85,7	

Tabela 2.2. TGM – sorogrupo Icterohaemorrhagiae e espécie *Rattus rattus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\frac{\text{anti} \sum \log^* n}{N}$
2560	6	3,4	20,4	339,44
1280	5	3,1	15,5	
640	7	2,8	19,6	
320	5	2,5	12,5	
160	7	2,2	15,4	
80	3	1,9	5,7	
40	6	1,6	9,6	
Total (N)	39		98,7	

Tabela 2.3. TGM – sorogrupo Icterohaemorrhagiae e espécie *Rattus norvegicus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\frac{\text{anti} \sum \log^* n}{N}$
10240	1	4	4	588,84
1280	4	3,1	12,4	
640	2	2,8	5,6	
320	1	2,5	2,5	
40	2	1,6	3,2	
Total (N)	10		27,7	

Tabela 2.4. TGM – sorogrupo Ballum e espécie *Mus musculus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\frac{\text{anti} \sum \log^* n}{N}$
80	1	1,9	1,9	56,23
40	1	1,6	1,6	
Total (N)	2		3,5	

3. Roedores com cultura negativa, em que foi efectuada a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira*

Tabela 3.1. TGM – sorogrupo Ballum e espécie *Rattus rattus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\text{anti} \sum \log^* n / N$
2560	1	3,4	3,4	108,73
320	5	2,5	12,5	
160	4	2,2	8,8	
80	3	1,9	5,7	
40	9	1,6	14,4	
Total (N)	22		44,8	

Tabela 3.2. TGM – sorogrupo Icterohaemorrhagiae e espécie *Rattus rattus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\text{anti} \sum \log^* n / N$
2560	1	3,4	3,4	151,58
1280	4	3,1	12,4	
640	2	2,8	5,6	
320	5	2,5	12,5	
160	4	2,2	8,8	
80	3	1,9	5,7	
40	12	1,6	19,2	
Total (N)	31		67,6	

Tabela 3.3. TGM – sorogrupo Ballum e espécie *Rattus norvegicus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\text{anti} \sum \log^* n / N$
1280	2	3,1	6,2	158,48
320	1	2,5	2,5	
160	2	2,2	4,4	
80	1	1,9	1,9	
40	3	1,6	4,8	
Total (N)	9		19,8	

Tabela 3.4. TGM – sorogrupo Icterohaemorrhagiae e espécie *Rattus norvegicus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM= $\text{anti} \sum \log^* n / N$
10240	1	4	4	749,89
1280	1	3,1	3,1	
640	1	2,8	2,8	
40	1	1,6	1,6	
Total	4		11,5	

Tabela 3.5. TGM – sorogrupo Ballum e espécie *Mus musculus*.

Títulos (T)	n	logT	log *n	TGM=$\text{anti} \sum \log^* n / N$
320	1	2,5	2,5	112,20
40	1	1,6	1,6	
Total	2		4,1	

Bibliografia

Sokal, R. R., Rohlf, F. J. 1969. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 776 pp.